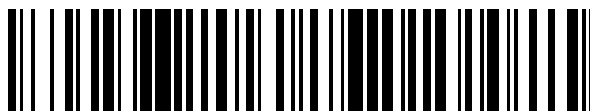


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 079**

51 Int. Cl.:

C12N 9/64

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2013 PCT/EP2013/075517**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2014 WO14086847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2013 E 13818680 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.04.2018 EP 2929025**

54 Título: **Método para la producción recombinante de la proteína del factor C de cangrejo herradura**

30 Prioridad:

05.12.2012 EP 12195742

06.12.2012 US 201261734002 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

27.06.2018

73 Titular/es:

HYGLOS INVEST GMBH (100.0%)

Am Neuland 1

82347 Bernried, DE

72 Inventor/es:

BUCHBERGER, BERND;

MOLINARO, SONJA y

GRALLERT, HOLGER

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 674 079 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para la producción recombinante de la proteína del factor C de cangrejo herradura

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención proporciona un nuevo método para la producción recombinante de la proteína del factor C del cangrejo herradura utilizando un protozoo parásito que expresa la proteína del factor C. Por consiguiente, la presente invención proporciona una célula huésped protozoaria parásito que alberga un polinucleótido que codifica la proteína C del factor de cangrejo herradura y un método para producir el factor C que comprende cultivar dicha célula huésped protozoaria parásito en condiciones tales que las células expresan la proteína del factor C de cangrejo herradura. La presente invención proporciona proteína del factor C recombinante del cangrejo herradura recombinante que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras producidas por el nuevo método y su uso en la detección y/o eliminación de endotoxina.

Técnica anterior

La endotoxina, también conocida como lipopolisacárido (LPS), es un componente integral de la membrana celular de bacterias gramnegativas y es responsable de muchos, si no de todos, los efectos tóxicos que se producen durante la sepsis por bacterias gramnegativas.

El LPS de bacterias gramnegativas induce a los amebocitos de los cangrejos de herradura a agregarse y desgranularse. Presumiblemente, la cascada de coagulación inducida por LPS representa un mecanismo de defensa importante utilizado por los cangrejos de herradura contra la invasión por bacterias gramnegativas. El lisado de amebocitos constituido como la prueba del lisado de amebocitos de *Limulus* (LAL) se ha usado durante décadas como herramienta para detectar concentraciones traza de endotoxina (LPS) en solución. El mecanismo molecular de la coagulación en el cangrejo herradura está establecido e implica una cascada de proteasas. Esta cascada se basa en 3 tipos de zimógenos de serina proteasa, factor C, factor B, enzima procoagulante y una proteína coagulable, coagulógeno. Al ser el activador inicial de la cascada de coagulación, el factor C funciona como biosensor que responde al LPS. Una vez que el factor C es "activado" por LPS, el resto activo creado tiene la capacidad de activar el factor B e hidrolizar sustratos tripéptidos sintéticos.

La actividad del factor C es la base de un ensayo muy sensible para los niveles de femtograma de endotoxina usados en el control de calidad de productos farmacéuticos y similares. La importancia del factor C en la detección de endotoxinas ha conducido a la expresión del factor C recombinante (rFC) como una fuente alternativa que debería aliviar los inconvenientes reconocidos con el lisado de amebocitos convencional como la variación estacional en la sensibilidad de la detección de endotoxina.

Para ensayos específicos de endotoxina, la proteína del factor C se ha purificado y clonado. Tras la activación por LPS, el factor C recombinante actúa sobre un sustrato sintético presente en la mezcla de ensayo para generar una señal detectable, indicando de ese modo la presencia de LPS en una muestra dada. En particular, un sustrato fluorogénico produce una señal fluorescente en proporción a la concentración de endotoxina en la muestra. La proteína del factor C se ha purificado y clonado para su aplicación en ensayos específicos de endotoxina.

Nakamura et al. (1986, Eur. J. Biochem. 154: 511-521) describen el aislamiento y la caracterización de la proteína del factor C nativa del cangrejo herradura *Tachypleus tridentatus*. La secuencia de ADNc que codifica la proteína del factor C de *T. tridentatus* fue publicada por Muta et al. (1991, J. Biol. Chem. 266:6554-6561). La secuencia de ADNc que codifica la proteína del factor C del cangrejo herradura *Carcinoscorpius rotundicauda* la publicó Ding et al. (1995, Molecular Marine Biology y Biotechnology 4:90-103). La expresión recombinante del factor C de *C. rotundicauda* en *E. coli* se describió en Roopashree et al. (1995, Biochem. Mol. Biol. Intl. 35:841-849). En el presente documento, la expresión de una proenzima de 108 kDa y las formas activadas de 78 kDa y 52 kDa se demostró mediante inmunodetección.

La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en la levadura *Pichia pastoris* se describe en Ding et al. (1996, patente de EE.UU. 5.858.706.). La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en *Saccharomyces cerevisiae* se describe en Roopashree et al. (1997, Biotechnology Letters 19:1147-1150).

La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en células de mamífero COS-1 células se describe en Roopashree et al. (1997, Biotechnology Letters 19: 357-361). En el presente documento, se expresó la proteína del factor C y se detectaron bandas de proteína con un peso molecular de 132 kDa, 130 kDa y 63 kDa. Las proteínas eran no secretadas, no solubles y no activas, sino más bien insolubles, asociadas con la fracción de desechos celulares.

La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en células de mamífero (células Sf9

transfectadas estables) se describe en Wang et al. (2001, Biotechnology Letters 23: 71-76). En el presente documento, la proteína del factor C se secretó en el sobrenadante con un peso molecular de 132 kDa, que indicó la glicosilación de la proteína. El Factor C obtenido fue funcionalmente activo en el sentido de que podría unirse a la endotoxina (LPS). Sin embargo, no se demostró conversión en una proteasa enzimáticamente activa. La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en las células de insectos también se describe en Wang et al. (2002, J. Biol. Chem. 277:36363-736372). En el presente documento, el Factor C se clonó y transfectó en células S2 de *Drosophila* y se expresó como una proteína soluble glicosilada, que se secretó en el sobrenadante del cultivo. La proteína del factor C recombinante era capaz de unirse a LPS, pero no se escindió para convertirse en una proteasa enzimáticamente activa. La expresión recombinante de la proteína del factor C de *C. rotundicauda* en células de insecto se describe además en el documento US 6.645.724 utilizando el sistema de baculovirus para la expresión en células Sf9.

El documento WO 01/32896 y Basile et al. (2009, Molecular Biotechnology, Vol. 43(3):273-278) se refieren a la expresión de proteína recombinante en parásitos de *Kinetoplastidae*, en particular en *Leishmania tarentolae*.

La proteína del factor C es una proteína eucariota compleja, que requiere varias etapas de conversión y modificaciones secundarias para convertirse en una proteasa activa. La expresión recombinante en procariotas (por ejemplo, *E. coli*) no proporciona glicosilación, escisión en la cadena H y la cadena L y formación correcta de puentes disulfuro. La expresión citosólica en sistemas simples de expresión eucariota (por ejemplo, levaduras) proporcionó el factor C, que era capaz de unirse a LPS, pero que no se activó tras la unión de LPS, es decir, no hubo conversión de la forma de zimógeno en una proteasa activa. Cuando se usan células de levadura (*Pichia* o *Saccharomyces*) para la expresión, no fue posible obtener el Factor C recombinante como proteína secretada. La expresión en una línea celular de mamífero tampoco proporcionó proteína secretada activa. Adicionalmente, la expresión en células de insecto transformadas estables proporcionó proteína secretada, que era capaz de unirse a LPS. Sin embargo, la activación por LPS no se demostró en este sistema. Finalmente, la expresión en células de insecto usando un sistema de expresión de baculovirus proporcionó proteína del factor C secretada, que era capaz de unirse a LPS, y que se convirtió en un zimógeno de serina proteasa activo tras la unión al LPS.

De toda la experiencia adquirida hasta ahora, los expertos que lograron la expresión de la proteína del factor C activa en células de insecto concluyeron que "la expresión en células de insecto en lugar de en un sistema de expresión eucariota, procariota o simple es adecuada para producir rFC con actividad biológica completa. Adicionalmente, los cangrejos de herradura y los insectos pertenecen al mismo filo, Arthropoda, por lo que las células de insecto podrían parecerse más a las células del cangrejo herradura que las células de levadura en su fisiología y bioquímica. Por lo tanto, el rFC producido en células de insecto podría parecerse más a la proteína purificada del cangrejo herradura y retener la bioactividad de tener una actividad de serina proteasa activada por LPS" (véase el documento WO 99/15676 en la página 2, "Sumario de la Invención"). Asimismo, el documento WO 2012/118226 se refiere a la producción de proteína del factor C recombinante de cangrejo herradura en células de insecto.

Desde entonces, es decir, más de 13 años después de la publicación del documento WO 99/15676, no se han realizado más intentos con respecto a la producción recombinante de la proteína del factor C activa. Obviamente, a la vista de los resultados obtenidos a lo largo de los años a partir de la expresión recombinante en diversos sistemas de huéspedes y en vista de la evaluación inequívoca dada por los principales expertos en el campo en el documento WO 99/15676, el sistema de expresión de baculovirus en células huésped de insecto se consideró la referencia para la producción recombinante de la proteína del factor C activa.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un nuevo método para la producción recombinante de la proteína del factor C del cangrejo herradura utilizando un protozoo parásito que expresa la proteína del factor C. En particular, la presente invención proporciona una célula huésped protozoaria parásito que alberga un polinucleótido que codifica la proteína C del factor de cangrejo herradura y un método para producir la proteína del factor C que comprende cultivar dicha célula huésped protozoaria parásito en condiciones tales que las células expresan la proteína del factor C de cangrejo herradura. Adicionalmente, la presente invención proporciona proteína del factor C recombinante del cangrejo herradura que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras producidas por el nuevo método y su uso en la detección y/o eliminación de endotoxina.

En particular, la presente invención proporciona:

- [1] Un protozoo parásito, que se caracteriza por albergar un polinucleótido que codifica la proteína del factor C del cangrejo herradura.
- [2] El protozoo parásito de [1], donde dicho polinucleótido está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, introducido en la célula huésped del protozoo parásito.
- [3] El protozoo parásito de [1] o [2], donde el protozoo parásito es un miembro del orden *Trypanosomatida*.
- [4] El protozoo parásito de uno cualquiera de [1] a [3], donde el protozoo parásito es un miembro del género

Leishmania.

[5] El protozoo parásito de uno cualquiera de [1] a [4], donde el protozoo parásito es *Leishmania tarentolae*.

[6] El protozoo parásito de uno cualquiera de [1] a [5], donde dicho polinucleótido codifica la proteína del factor C de *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Tachypleus tridentatus* o *Tachypleus gigas*.

[7] El protozoo parásito de uno cualquiera de [1] a [6], donde dicho polinucleótido codifica la proteína del factor C que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

[8] Un método para producir proteína del factor C de cangrejo herradura que comprende las etapas de: (a) cultivar un protozoo parásito de uno cualquiera de [1] a [7] en condiciones tales que las células expresan la proteína del factor C codificada por el polinucleótido; y (b) recuperar la proteína del factor C producida en la etapa (a) del cultivo celular.

[9] El método de [8], donde dicha proteína del factor C se acumula en el medio de cultivo celular.

[10] El método de [8] o [9], donde el protozoo parásito es un miembro del género *Leishmania*.

[11] El método de [10], donde la proteína del factor C producida exhibe actividad de serina proteasa al unirse a la endotoxina.

[12] Proteína del factor C de cangrejo herradura que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras obtenible mediante a) el método de [10]; o b) el método de [11].

[13] Uso de la proteína del factor C de cangrejo herradura de [12] b) en un método para la detección de endotoxinas o en un método para la eliminación de endotoxinas.

[14] Un ensayo o kit para la detección de endotoxina o la eliminación de endotoxina, que comprende la proteína del factor C del cangrejo herradura de [12] b).

[15] Un proceso de generación de una célula huésped protozoaria parásita que produce proteína del factor C de cangrejo herradura, que comprende las etapas de: (a) introducir una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura en un protozoo parásito, preferentemente un protozoo parásito del orden *Trypanosomatida*, más preferentemente un miembro del género *Leishmania*, de la forma más preferente *Leishmania tarentolae*; y (b) seleccionar una o más células huésped producidas en la etapa (a) que expresan dicha proteína del factor C de cangrejo herradura.

[16] Una célula huésped de protozoo parásito caracterizada por un polinucleótido que codifica la proteína del factor C del cangrejo herradura, donde dicho polinucleótido está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, introducido en la célula huésped del protozoo parásito.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: muestra el gráfico de los valores de rfu medidos de muestras del factor C recombinante (rFC) activado por LPS después de 15 minutos de recambio de sustrato a 37 °C en dependencia de la concentración de rFC. Se indica la concentración de rFC utilizada para el cálculo de la actividad específica.

Descripción detallada de la invención

El factor C de los cangrejos herradura está bien establecido para su uso en la detección y eliminación de endotoxinas. En el pasado se han realizado intentos para producir Factor C mediante expresión recombinante como una fuente alternativa al lisado de amebocitos convencional, el extracto acuoso de células sanguíneas (amebocitos) de cangrejos herradura. Muchos intentos en la técnica de la expresión recombinante del factor C fallaron debido a que el factor C recombinante (rFC) producido en diversas células huésped ha demostrado que no muestra la actividad biológica requerida para su uso en los métodos de detección de endotoxina. Las células huésped aplicadas en la técnica fueron células procariotas, células eucariotas simples y células eucariotas superiores, y después de años de intensa investigación, los expertos en el campo concluyeron que la expresión en células de insectos en lugar de en un sistema de expresión procariota o eucariota simple, es adecuado para producir rFC con actividad biológica completa. En relación con esto, los expertos en el campo explicaron que los insectos y cangrejos herradura pertenecen al mismo filo, Arthropoda, por lo que las células de insecto podrían parecerse más a las células del cangrejo herradura que las células de levadura en su fisiología y bioquímica. Por lo tanto, el rFC producido en células de insecto podría parecerse más a la proteína purificada a partir del cangrejo herradura y retener la bioactividad de tener una actividad de serina proteasa activada por LPS.

La presente invención proporciona un nuevo método para la producción recombinante de la proteína del factor C del cangrejo herradura utilizando un protozoo parásito que expresa la proteína del factor C. En particular, la presente invención proporciona una célula huésped protozoaria parásita que alberga un polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura y un método para producir la proteína del factor C que comprende cultivar dicha célula huésped protozoaria parásita en condiciones tales que las células expresan la proteína del factor C de cangrejo herradura. Adicionalmente, la presente invención proporciona proteína del factor C recombinante del cangrejo herradura que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras producidas por el nuevo método y su uso en la detección y/o eliminación de endotoxina.

Los protozoos son organismos eucariotas unicelulares simples. El objeto de la presente invención no era obvio para

el experto en la materia porque la técnica ha llevado a utilizar sistemas de expresión eucariotas simples para producir con éxito la proteína del factor C activa, tal como se ha explicado anteriormente en el presente documento. Adicionalmente, fue sorprendente que el sistema básico de chaperonas de protozoos proporcione un plegamiento correcto del Factor C recombinante, teniendo en cuenta que más de 20 enlaces disulfuro deben estar conectados adecuadamente para obtener la proteína del factor C. No se podía esperar que las células huésped protozoarias de la presente invención proporcionen el factor C recombinante de cangrejo herradura, que permite la escisión correcta de la pre-pro-enzima y la proenzima en la proteasa activa compuesta por una cadena pesada (H) y una ligera (L). Asimismo, el uso de protozoos proporcionado por la presente invención para la expresión de la proteína del factor C recombinante de cangrejo herradura tiene las siguientes ventajas:

En primer lugar, si bien el uso de células de insecto para la producción recombinante de la proteína del factor C está asociado con altos costes debido al hecho de que se requieren medios de cultivo especiales costosos, el uso de protozoos es barato porque los medios requeridos son baratos, siendo el equipo y las condiciones de cultivo similares a la fermentación de las bacterias. Asimismo, los cultivos de protozoos crecen relativamente rápido (tiempo de generación rápida) y son fáciles de aumentar. Adicionalmente, una vez clonado, el huésped de expresión recombinante es estable y no requiere la preparación continua de reservas de virus infeccioso. Se ha demostrado que la proteína del factor C recombinante producida en cultivos de protozoos de la presente invención se secreta con buen rendimiento y en forma soluble, y puede purificarse fácilmente del sobrenadante del cultivo. Específicamente, solo una forma activa del Factor C se purifica del sobrenadante sin productos de degradación. Cabe destacar que la proteína recombinante expresada es estable y no se requieren aditivos para proteger la forma de zimógeno.

Células huésped

La presente invención proporciona un protozoo parásito, que se caracteriza por albergar un polinucleótido que codifica una proteína del factor C heteróloga del cangrejo herradura. El protozoo parásito proporcionado por la presente invención se usa para la producción recombinante del Factor C a partir de un cangrejo herradura. Por lo tanto, la presente invención proporciona una célula huésped de protozoo parásito para la producción recombinante de factor C de cangrejo herradura, donde la célula huésped de protozoo parásitos se caracteriza por albergar un polinucleótido que codifica una proteína de Factor C de cangrejo herradura.

La célula huésped de la presente invención para la producción recombinante de factor C de cangrejo herradura es una célula huésped de protozoo parásito. Preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula huésped de protozoo parásito de cinetoplastido. La característica taxonómica común de estas células huésped es una sola mitocondria con una masa densa de ADN extranuclear. La región de la mitocondria que contiene el ADN se denomina "cinetoplasto" y el ADN se denomina "ADN de cinetoplasto". La subunidad pequeña de ARNr y las filogenias proteicas conservadas respaldan la división de los cinetoplastidos en cinco órdenes: Prokinetoplastida, Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida y Trypanosomatida. Por lo tanto, los protozoos parásitos cinetoplastidos preferentes de la presente invención son los parásitos Prokinetoplastida, Neobodonida, Parabodonida, Eubodonida o Trypanosomatida. Preferentemente, los protozoos parásitos cinetoplastidos de la presente invención son tripanosomátidos parásitos (es decir, Tripanosomatida parasitaria). Dado que todos los miembros de los tripanosomátidos son parásitos, simplemente el término "tripanosomátidos" se usa en el presente documento para describir tripanosomátidos parásitos (es decir, Tripanosomatida parasitaria).

Los tripanosomátidos consisten en LOS géneros monogenéticos tales como *Crithidia*, *Leptomonas* y *Blastocrithidia*, y los géneros digenéticos tales como *Leishmania* y *Trypanosoma*. En la presente invención, Los protozoos parásitos cinetoplastidos preferentes son tripanosomátidos digenéticos (es decir, miembros digenéticos del orden Trypanosomatida). Más preferentemente, la célula huésped de la presente invención es un miembro del género *Leishmania*. Aún más preferentemente, la célula huésped de la presente invención es *Leishmania major* o *Leishmania tarentolae*. En la presente invención, la célula huésped más preferente es *Leishmania tarentolae*. En diversas realizaciones, la célula huésped de la presente invención es un miembro del género *Trypanosoma*. En realizaciones preferidas, la célula huésped de la presente invención se selecciona de las especies *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma theileri*.

Aunque los tripanosomas son importantes causas de enfermedades humanas y animales, muchas especies no son patógenas. Los protozoos de tripanosomátidos de la presente invención son, preferentemente, protozoos parásitos cinetoplastidos no patógenos (Kinetoplastidae no patógeno), más preferentemente protozoos tripanosomátidos no patógenos (Tripanosomatidae no patógeno), aún más preferentemente *Leishmania* no patógeno. Las especies preferentes no patógenas de Kinetoplastidae incluyen, aunque no de forma limitativa, *Leishmania tarentolae*, *Crithidia fasciculata*, *Wallaceina inconstans* (antes *Proteomonas inconstans*), *Leptomonas collosus*, *Leptomonas* sp. y *Leptomonas seymouri*. El protozoo no patógeno más preferente de la presente invención es *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, las células huésped de protozoos parásitos de la presente invención son células huésped de protozoos patógenos atenuados, es decir, su patogenicidad ha sido atenuada, preferentemente atenuada genéticamente. Un enfoque para atenuar patógenos es la eliminación de genes dirigida. Por lo tanto, se pueden

obtener parásitos tripanosomátidos genéticamente atenuados (es decir, protozoos parásitos tripanosomátidos) mediante la eliminación de genes seleccionados (por ejemplo, genes que codifican factores de virulencia). La eliminación del gen aprovecha el hecho de que este parásito puede experimentar una recombinación homóloga entre secuencias de ADN endógenas y extrañas introducidas artificialmente en las células. Los protozoos parásitos atenuados, preferentemente parásitos tripanosomátidos atenuados, usados en la presente invención tienen una virulencia atenuada, en particular una virulencia atenuada para los seres humanos.

Se entenderá que a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones, el uso de términos como "Kinetoplastidae no patógena" o "Tripanosomatidae no patógena" se refiere no solo a organismos/huéspedes abarcados en las especies mencionadas anteriormente, sino que también incluye las especies en esquemas de clasificación alternativos, pero que poseen las mismas características o rasgos morfológicos y culturales definidos anteriormente, y pueden ser sinónimos de "Kinetoplastidae no patógena" y "Tripanosomatidae no patógena".

Tal como se usa en el presente documento, el término no patógeno incluye, aunque no de forma limitativa, el significado no patógeno para seres humanos. En diversas realizaciones, "no patógeno" se define mediante la clasificación de los organismos en las preguntas al Nivel 1 de Bioseguridad.

En diversas realizaciones, la célula huésped protozoaria comprende un marcador seleccionable, preferentemente un gen marcador seleccionable.

Sistema de expresión

La presente invención proporciona una célula huésped protozoaria que comprende un polinucleótido que codifica una proteína del factor C heteróloga de un cangrejo herradura. Tal como se usa en el presente documento, proteína heteróloga significa una proteína que no es nativa de la célula huésped. La célula huésped protozoaria de la presente invención representa un sistema de expresión para la producción recombinante de la proteína del factor C de cangrejo herradura. Por lo tanto, en el presente documento se divulga un sistema de expresión que comprende una célula huésped protozoaria y un polinucleótido que codifica una proteína del factor C heteróloga de cangrejo herradura, así como el uso del sistema de expresión para la expresión de una proteína del factor C heteróloga de un cangrejo herradura. Aunque el sistema de expresión divulgado en el presente documento puede comprender la célula huésped y el polinucleótido como un medio separado, también puede comprender una célula huésped de protozoo parásito, que ya alberga el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heteróloga de cangrejo herradura.

En diversas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heteróloga del cangrejo herradura está unido operativamente a una secuencia promotora adecuada y, si es adecuado, a secuencias señal postranscripcionales, que son capaces de dirigir la expresión del polinucleótido que codifica la proteína del factor C en la célula huésped de la presente invención. Preferentemente, el promotor es un promotor de un gen transcrito de forma activa de un protozoo parásito cinetoplástico. Más preferentemente, el promotor es un promotor de un gen transcrito de forma activa de un miembro del orden *Trypanosomatida*, aún más preferentemente, el promotor es un promotor de un gen transcrito de forma activa de un miembro del género *Leishmania*, de la forma más preferente el promotor es un promotor de un gen transcrito de forma activa de *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, el promotor es un promotor heterólogo fuerte de iniciación de la transcripción.

El polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura utilizado en la presente invención es un polinucleótido heterólogo, en particular un polinucleótido heterólogo que codifica la proteína del factor C heteróloga de cangrejo herradura. Tal como se usa en el presente documento, polinucleótido heterólogo significa un polinucleótido que no es nativo de la célula huésped. En diversas realizaciones, la transcripción del polinucleótido heterólogo utilizado en la presente invención está controlada por un elemento sensible a un represor en conexión con un gen represor incorporado y expresado.

En diversas realizaciones, al menos una copia del polinucleótido heterólogo está localizada en un grupo de genes transcritos activamente de la célula huésped protozoo de la presente invención. Preferentemente, el grupo de genes transcritos activamente es un grupo de genes de ARNr.

En diversas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heteróloga está flanqueado por UTR (regiones no traducidas sin traducir) en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un protozoo parásito cinetoplástico. Preferentemente, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heteróloga está flanqueado por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un miembro del orden *Trypanosomatida*, más preferentemente por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un miembro del género *Leishmania*, y aún más preferentemente por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heterólogo está flanqueado por una o más secuencias señal, que proporcionan, por ejemplo, secreción eficiente, corte y empalme y/o poliadenilación de un gen transcrito activamente de un protozoo parásito cinetoplástico, es decir, la secuencia señal es una secuencia

señal de un gen transcrito activamente de un protozoo parásito cinetoplástido. Preferentemente, la proteína del factor C heteróloga está flanqueada por una o más secuencias señal de un gen transcrito activamente de un miembro de la orden *Trypanosomatida*, más preferentemente por una o más secuencias señal de un gen transcrito activamente de un miembro del género *Leishmania*, y aún más preferentemente por una o más secuencias señal de un gen transcrito activamente de *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, la proteína del factor C heteróloga está flanqueada por la secuencia señal derivada de la fosfatasa ácida de *Leishmania mexicana* (Wiese et al. 1995, EMBO J. 14:1067-1074).

En diversas realizaciones, el sistema de expresión de la presente invención está sustancialmente exento de la producción de proteasas, toxinas y grandes cantidades de otras proteínas secretadas y sintetizadas endógenamente de la célula huésped.

Las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos del factor C y sus variantes

La proteína del factor C codificada por un polinucleótido usado en la presente invención es una proteína del factor C heteróloga. El polinucleótido usado en la presente invención comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica el factor C, que exhibe actividad enzimática de tipo factor C de un cangrejo herradura. El alcance de la presente invención abarca el uso de polinucleótidos que codifican el factor C con una secuencia de aminoácidos tal como se encuentra en su fuente natural, es decir, una secuencia de aminoácidos del Factor C tal como se puede obtener a partir de cangrejos herradura, así como el uso de polinucleótidos que codifican variantes de una secuencia de aminoácidos del factor C como se describe en el presente documento. El alcance de la presente invención también abarca el uso de polinucleótidos que comprenden la secuencia de aminoácidos del factor C tal como se encuentra en su fuente natural, es decir, una secuencia de ácido nucleico del Factor C tal como se puede obtener a partir de cangrejos herradura, así como el uso de polinucleótidos que comprenden una variante de una secuencia de ácido nucleico del factor C como se describe en el presente documento. En cualquier caso, un polinucleótido usado en la presente invención codifica una proteína del factor C, que muestra actividad enzimática de tipo factor C al activarse con endotoxina. La definición de "actividad enzimática de tipo factor C" se proporciona en otra parte del presente documento.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención que codifica la proteína del factor C se modifica mediante la inserción, delección, adición y/o sustitución de uno o más ácidos nucleicos, con la condición de que la proteína del factor C obtenida a partir de la expresión de dicho polinucleótido modificado en una célula huésped de protozoo parásito de acuerdo con la presente invención muestra actividad enzimática de tipo factor C al activarse con endotoxina, quimotripsina (en particular a α -quimotripsina) o lípido A.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención es el polinucleótido que codifica el factor C de *Tachypleus tridentatus* o *Tachypleus gigas*. En diversas realizaciones, el polinucleótido codifica el factor C de *Carcinoscorpius rotundicauda*. En diversas realizaciones, el polinucleótido codifica el factor C de *Limulus polyphemus*. En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención comprende la secuencia de ácido nucleico que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 del listado de secuencias.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención es idéntico al menos en un 75 % a un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática similar a factor C. Preferentemente, el polinucleótido presenta una identidad de al menos un 85 % o una identidad de al menos un 95 % con un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática similar a factor C. Más preferentemente, el polinucleótido presenta una identidad de al menos un 96% o una identidad de al menos un 97% con un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática similar a factor C. Incluso más preferentemente, el polinucleótido presenta una identidad de al menos un 98% o una identidad de al menos un 99% con un polinucleótido que codifica el polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática similar a factor C.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Preferentemente, el polinucleótido codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % o al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Más preferentemente, el polinucleótido codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 96 % o al menos un 97 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Incluso más preferentemente, el polinucleótido codifica un polipéptido, que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos un 98% o al menos un 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y que exhibe actividad enzimática de tipo factor C.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención es un polinucleótido, que hibrida en

condiciones rigurosas con cualquiera de los polinucleótidos descritos en el presente documento, donde el polinucleótido que hibrida codifica un polipéptido, que exhibe actividad enzimática de tipo factor C.

5 En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención es al menos un 75 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Preferentemente, el polinucleótido usado en la presente invención es al menos un 85 % o al menos un 95 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Más preferentemente, el polinucleótido usado en la presente invención es al menos un 96% o al menos un 97% idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID
10 NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Incluso más preferentemente, el polinucleótido usado en la presente invención es al menos un 98% o al menos un 99% idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C.

15 En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención comprende una parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es al menos un 75 % idéntica a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 3 y que codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C, donde dicha parte codifica un fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe
20 actividad enzimática de tipo factor C. Preferentemente, el polinucleótido comprende una parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es al menos un 85 % o al menos un 95 % idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y que codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C, donde dicha parte codifica un fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Más preferentemente, el polinucleótido comprende una parte
25 de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es al menos un 96% o al menos un 97% idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y que codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C, donde dicha parte codifica un fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Incluso más preferentemente, el polinucleótido comprende una parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es al menos un 98% o al menos un 99% idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y que codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C, donde dicha parte codifica un fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y
30 donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe actividad enzimática de tipo factor C. Incluso más preferentemente, el polinucleótido comprende una parte de la secuencia de nucleótidos del polinucleótido que es al menos un 98% o al menos un 99% idéntico a la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:1 o la SEQ ID NO: 3 y que codifica un polipéptido que exhibe actividad enzimática de tipo factor C, donde dicha parte codifica un fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4, y
35 donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe actividad enzimática de tipo factor C.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención es el complementario de la longitud completa de cualquiera de los polinucleótidos, que se describen en el presente documento y que se pueden usar en la presente invención, donde el polinucleótido complementario codifica un polipéptido que exhibe actividad
40 enzimática de tipo factor C.

La presente invención abarca específicamente el uso de las secuencias de ácido nucleico que codifican el Factor C del cangrejo herradura *Carcinoscorpius rotundicauda* como se describe en el documento WO 99/15676. En particular, la presente invención incluye por referencia el uso de las secuencias de nucleótidos representativas
45 presentadas como SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 o del documento WO 99/15676. Del mismo modo, el uso de las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 2 y 4 del documento WO 99/15676, que representan las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3 del documento WO 99/15676, respectivamente, están incluidas explícitamente en la presente invención por referencia.

50 Las secuencias SEQ ID NOs: 1 a 4 del documento WO 99/15676 no corresponden a las SEQ ID NOs: 1 a 4 del listado de secuencias de la presente especificación. Cuando se hace referencia en la presente invención a cualquiera de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 a 4, se entiende cualquiera de las secuencias de SEQ ID NOs: 1 a 4 del listado de secuencias de la presente especificación. Por el contrario, las secuencias SEQ ID NOs: 1 a 4 del documento de WO 99/15676 se abordan en el presente documento mediante referencia explícita al documento WO
55 99/15676, como se muestra en el párrafo anterior.

El alcance de la presente invención abarca la producción recombinante de un polipéptido del factor C codificado por cualquiera de los polinucleótidos y moléculas de ácido nucleico descritos en el presente documento. Por supuesto, el alcance de la presente invención también abarca el polipéptido del factor C recombinante obtenido a partir de
60 cualquier proceso de producción de este tipo.

En diversas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de la proteína del factor C de la presente invención se modifica mediante la inserción, delección, adición y/o sustitución de uno o más restos de aminoácidos, con la condición de que la proteína del factor C que tiene dicha secuencia de aminoácidos modificada después de la
65 expresión recombinante en una célula huésped de protozoo parásito de acuerdo con la presente invención muestre actividad enzimática de tipo factor C al activarse con endotoxina, quimotripsina o lípido A.

El significado del término "uno o más restos de aminoácidos" en la oración anterior varía dependiendo de las posiciones de los restos de aminoácidos en la estructura tridimensional de la proteína del factor C y los tipos de restos de aminoácidos. Más particularmente, dicho término significa, preferentemente, de 1 a 20 restos de aminoácidos, más preferentemente de 1 a 10 restos de aminoácidos, aún más preferentemente de 1 a 5 aminoácidos e incluso más preferentemente de 1 a 3 restos de aminoácidos. En diversas realizaciones, la inserción, 5 delección, adición y/o sustitución descritas anteriormente de uno o más aminoácidos es una mutación conservadora que mantiene la actividad enzimática de la proteína del factor C tras la activación de la forma zimógena por endotoxina, quimotripsina o lípido. A. Una mutación conservadora de ejemplo es una sustitución conservadora. La sustitución conservadora es, *por ejemplo*, una mutación donde la sustitución tiene lugar mutuamente entre Phe, Trp 10 y Tyr, si el sitio de sustitución es un aminoácido aromático; entre Leu, Ile y Val, si el sitio de sustitución es un aminoácido hidrófobo; entre Gln y Asn, si el sitio de sustitución es un aminoácido polar; entre Lys, Arg e His, si el sitio de sustitución es un aminoácido básico; entre Asp y Glu, si el sitio de sustitución es un aminoácido ácido; y entre Ser y Thr, si el sitio de sustitución es un aminoácido que tiene un grupo hidroxilo. Ejemplos de sustituciones consideradas como sustituciones conservadoras incluyen en particular la sustitución de Ser o Thr por Ala, la sustitución de Gln, His, o Lys por Arg, la sustitución de Glu, Gln, Lys, His, o Asp por Asn, la sustitución de Asn, Glu, 15 o Gln por Asp, la sustitución de Ser o Ala por Cys, la sustitución de Asn, Glu, Lys, His, Asp, o Arg por Gln, la sustitución de Gly, Asn, Gln, Lys, o Asp por Glu, la sustitución de Pro por Gly, la sustitución de Asn, Lys, Gln, Arg, o Tyr por His, la sustitución de Leu, Met, Val, o Phe por Ile, la sustitución de Ile, Met, Val, o Phe por Leu, la sustitución de Asn, Glu, Gln, His, o Arg por Lys, la sustitución de Ile, Leu, Val, o Phe por Met, la sustitución de Trp, Tyr, Met, Ile, 20 o Leu por Phe, la sustitución de Thr o Ala por Ser, la sustitución de Ser o Ala por Thr, la sustitución de Phe o Tyr por Trp, la sustitución de His, Phe, o Trp por Tyr, y la sustitución de Met, Ile, o Leu por Val.

La presente invención abarca cualquiera de las inserciones, delecciones, adiciones y/o sustituciones descritas anteriormente en las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o 4.

Las inserciones, delecciones, adiciones y/o sustituciones descritas anteriormente también abarcan una mutación de origen natural debida a la diferencia en la cepa o especie individual entre los cangrejos herradura de los que deriva el gen del factor C. Adicionalmente, las inserciones, delecciones, adiciones y/o sustituciones descritas anteriormente también abarcan una mutación de origen natural en el curso de la expresión recombinante de la proteína del factor C 25 en la célula huésped individual.

En diversas realizaciones, la proteína del factor C producida mediante un método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos del factor C de *Tachypleus tridentatus* o *Tachypleus gigas*. En diversas realizaciones, la proteína del factor C producida mediante un método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos del factor C de *Carcinoscorpius rotundicauda*. En diversas realizaciones, la proteína del factor C producida mediante un método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos del factor C de *Limulus polyphemus*. En diversas realizaciones, la proteína del factor C producida por un método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

En diversas realizaciones, el polinucleótido usado en la presente invención codifica un polipéptido que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o un fragmento, análogo o derivado funcional del mismo, donde dicho fragmento, análogo o derivado funcional del polipéptido exhibe actividad enzimática de tipo factor C. La presente invención abarca fragmentos, análogos y/o derivados funcionales de cualquiera de los polipéptidos del factor C descritos en el presente documento, siempre que dichos fragmentos, análogos y/o derivados funcionales muestren actividad enzimática de tipo factor C tras la activación con endotoxina, quimotripsina o lípido A.

Para la producción recombinante del factor C de cangrejo herradura según la presente invención, el protozoo parásito comprende un polinucleótido que codifica la proteína del factor C recombinante de un cangrejo herradura. Por lo tanto, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura utilizado en la presente invención es un polinucleótido heterólogo, más específicamente un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína del factor C heteróloga de un cangrejo herradura.

En aras de la claridad, cualquier variante de una proteína del factor C de cangrejo herradura descrita en el presente documento todavía se considera una proteína del factor C de cangrejo herradura, al menos en vista del hecho de que cualquier variante descrita en el presente documento se define que exhibe actividad enzimática de tipo factor C de cangrejo herradura.

Actividad enzimática de tipo factor C

Los zimógenos (o proenzimas) son precursores de enzimas. Aunque los zimógenos a veces se denominan precursores inactivos de enzimas, el zimógeno no es "inactivo" en el sentido de que ha perdido su actividad (debido a diferentes factores), sino que es una molécula que necesita ser activada para convertirse en una enzima activa.

El factor C de los cangrejos herradura sigue siendo un zimógeno hasta que encuentra niveles traza de endotoxina. Tras la activación por endotoxina (o quimotripsina o lípido A), el factor C de cangrejo herradura muestra inequívocamente la actividad enzimática completa, lo que indica la presencia de endotoxina (por ejemplo, en una

muestra para analizar la endotoxina) hidrolizando un sustrato sintético del factor C, que forma un producto medible/detectable. El factor C recombinante (rFC) de la presente invención se produce como un factor C de tipo zimógeno a partir de su fuente natural. Adicionalmente, el rFC de la presente invención también sigue siendo un zimógeno hasta que encuentra niveles traza de endotoxina. Tras la activación por endotoxina (o quimotripsina o

En vista de lo anterior y solo por el bien de la claridad, se observa que la "actividad enzimática de tipo factor C" significa la actividad enzimática del factor C de un cangrejo herradura medida para la forma activada. En otras palabras, "actividad enzimática de tipo factor C" significa actividad enzimática del factor C de cangrejo herradura activado por endotoxina, quimotripsina o lípido A. Por tanto, si la proteína de factor C recombinante producida por un método de la presente invención se describe en el presente documento que tiene o exhibe actividad enzimática de tipo factor C, está claro que se quiere decir la actividad enzimática del zimógeno activado. En otras palabras, "actividad enzimática del factor C de un cangrejo herradura" como se usa en el presente documento significa "actividad enzimática de factor C activado de un cangrejo herradura" o "actividad enzimática de zimógeno de factor C activado de un cangrejo herradura".

En diversas realizaciones, los términos "Factor C (recombinante) de la presente invención" y "Factor C zimógeno (recombinante) de la presente invención" pueden usarse indistintamente. Aunque el rFC obtenido directamente de un método de la presente invención es un precursor de la enzima del Factor C, el zimógeno rFC de la presente invención no es "inactivo" en el sentido de que ha perdido su actividad (debido a diferentes factores). Más bien, el zimógeno de rFC de la presente invención es una molécula que necesita ser activada para convertirse en una enzima activa.

La actividad enzimática del factor C de un cangrejo herradura es específicamente actividad hidrolítica, más específicamente, la actividad proteolítica, y aún más específicamente la actividad de la serina proteasa. Por lo tanto, la actividad enzimática de tipo factor C como se describe en el presente documento significa específicamente actividad hidrolítica de tipo factor C de cangrejo herradura, más específicamente, actividad proteolítica de tipo factor C de cangrejo herradura, y aún más específicamente actividad de serina proteasa de tipo factor C de cangrejo herradura.

La actividad enzimática de una proteína del factor C de cangrejo herradura se puede medir mediante, *por ejemplo*, un ensayo cromogénico o fluorométrico. En particular, la actividad enzimática de un factor C de cangrejo herradura puede ser verificada por, *por ejemplo*, una señal cromogénica o fluorogénica detectable, que se produce debido a la escisión/hidrólisis de un sustrato del Factor C por el Factor C activado. Los ensayos adecuados para detectar la actividad del Factor C se describen en la técnica y el experto en la materia no tendrá ningún problema en realizar un ensayo para detectar/medir la actividad enzimática de una proteína del factor C dada. Los sustratos para el factor C también se describen y están disponibles en la técnica. El alcance de la presente invención abarca el uso de sustratos de factor C cromogénicos y fluorogénicos, que incluyen, aunque no de forma limitativa, sustratos de peptidil-pNA cromogénicos y sustratos de peptidil-AMC, peptidil-AFC y peptidil-MCA fluorogénicos. Los sustratos del factor C a modo de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, N-t-Boc-DPR-AMC, N-t-Boc-VPR-MCA, N-t-Boc-VPR-AMC, Mu-VPR-AFC y Boc-VPR-pNA.

En diversas realizaciones, el rFC proporcionado por la presente invención muestra la actividad enzimática del factor C de cangrejo herradura que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, más específicamente, la actividad hidrolítica del factor C de cangrejo herradura que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, aún más específicamente la actividad proteolítica del factor C de cangrejo herradura que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 e incluso más específicamente la actividad serina proteasa del factor C de cangrejo herradura que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

Forma zimógeno de dos cadenas del Factor C

Se sabe que el factor C de un cangrejo herradura en su forma de zimógeno comprende una cadena pesada (H) y una cadena ligera (L) (también llamada forma bicatenaria). El factor C recombinante de la presente invención también se produce en la forma de zimógeno de dos cadenas. Específicamente, el factor C zimógeno obtenido mediante los métodos proporcionados por la presente invención también comprende una cadena H y una cadena L. Por lo tanto, los términos "Factor C de la presente invención" y "Factor C zimógeno de la presente invención" pueden usarse indistintamente, tal como se ha mencionado anteriormente en el presente documento. Como alternativa, el "factor C zimógeno (recombinante) de la presente invención" se puede designar como "factor C proenzima (recombinante) de la presente invención". En cualquier caso, el factor C recombinante obtenido directamente de un método de la presente invención se caracteriza por la forma de zimógeno de dos cadenas que comprende una cadena pesada (H) y una cadena ligera (L).

El peso molecular de la proteína del factor C de la SEQ ID NO: 4 calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos primaria es de 110 kDa (109,7 kDa). El alcance de la presente invención abarca realizaciones, en las que el factor C recombinante de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos primaria modificada, *por*

ejemplo, un truncamiento en el extremo N o C. En tales casos, se cambia el peso molecular calculado sobre la base de la secuencia primaria. Por lo tanto, calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos primaria, el alcance de la presente invención abarca proteínas recombinantes del factor C que tienen cualquier peso molecular en el intervalo entre 90 y 130 kDa, preferentemente cualquier peso molecular en el intervalo entre 95 y 125 kDa, más preferentemente cualquier peso molecular en el intervalo entre 100 y 120 kDa, y aún más preferentemente cualquier peso molecular en el intervalo entre 105 y 115 kDa. Incluso más preferentemente, la proteína del factor C recombinante de la presente invención tiene un peso molecular en el intervalo de 108 a 112 kDa, calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos primaria.

De manera sorprendente, el peso molecular de la forma de zimógeno del Factor C determinado por SDS-PAGE resultó ser inferior al peso molecular calculado sobre la base de la secuencia de aminoácidos primaria. En particular, la forma de zimógeno del factor C producido por un método de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 102 kDa según se determina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras. Adicionalmente, la forma de zimógeno del factor C producido por un método de acuerdo con la presente invención tiene un peso molecular de 106 kDa (incluyendo glicosilación) según se determina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras, resultante de un peso molecular de 69 kDa determinado para la cadena H y un peso molecular de 37 kDa para la cadena L. Por lo tanto, la presente invención abarca proteínas del factor C recombinantes que tienen un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras y proteínas del factor C recombinantes que tienen un peso molecular de aproximadamente 106 kDa (incluyendo glicosilación) según lo determinado por SDS-PAGE en condiciones reductoras.

Tras la activación del factor C en presencia de endotoxina, quimotripsina o lípido A (conversión autocatalítica del factor C en la forma activada), se produce una escisión en la cadena L, lo que da lugar a la aparición de dos nuevos fragmentos, una cadena B y una cadena A. Por lo tanto, el factor C recombinante de la presente invención se caracteriza además porque la activación de la forma de zimógeno obtenida directamente de un método de la presente invención por endotoxina, quimotripsina o lípido A (conversión autocatalítica del factor C en la forma activada) da como resultado factor C activado que comprende una cadena B y una cadena A debido a la escisión de la cadena L del factor C zimógeno.

Vectores y plásmidos

En diversas realizaciones, el polinucleótido que codifica la proteína del factor C heteróloga de cangrejo herradura utilizada en la presente invención está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, que se introduce en la célula huésped de protozoo parásito. En otras palabras, en diversas realizaciones, el polinucleótido que codifica una proteína del factor C heteróloga de cangrejo herradura de acuerdo con la presente invención se incorpora en un vector o un plásmido. En diversas realizaciones, se usan dos o más de tales vectores o plásmidos. En diversas realizaciones, el vector o plásmido es un vector lineal o un plásmido lineal. En diversas realizaciones adicionales, el vector o plásmido puede ser un vector circular o un plásmido circular.

En el presente documento se divulga un vector o plásmido que comprende un polinucleótido heterólogo utilizado en la presente invención, es decir, un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína del factor C heteróloga de un cangrejo herradura. El polinucleótido heterólogo puede estar flanqueado por UTR (regiones no traducidas sin traducir) en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un protozoo parásito cinetoplástico. Específicamente, el polinucleótido heterólogo que codifica la proteína del factor C heteróloga puede estar flanqueado por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un miembro del orden *Trypanosomatida*, más específicamente por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de un miembro del género *Leishmania*, y aún más específicamente por UTR en 5' y 3' de un gen transcrito activamente de *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, el vector o plásmido comprende un promotor, que está localizado corriente arriba del polinucleótido heterólogo.

En diversas realizaciones, el vector o plásmido comprende un promotor, que está localizado corriente arriba del polinucleótido heterólogo, además de las UTR en 3' y 5'.

En diversas realizaciones, el vector o plásmido comprende una o más secuencias señal para una secreción, un empalme y/o una poliadenilación eficaces de la proteína del factor C heteróloga que resulta de la expresión del polinucleótido heterólogo en la célula huésped del protozoo. En diversas realizaciones, la secuencia señal deriva de un protozoo parásito cinetoplástico. Preferentemente, la secuencia señal deriva de un miembro de la orden *Trypanosomatida*, más preferentemente de un miembro del género *Leishmania*, y aún más preferentemente de *Leishmania tarentolae*.

Lo más preferentemente, la secuencia señal tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. También se divulgan en el presente documento variantes como fragmentos y/o derivados funcionales de dichas secuencias señal, en particular de la secuencia señal de la SEQ ID NO: 5.

En diversas realizaciones, el vector o plásmido comprende uno o más genes marcadores seleccionables.

En el presente documento se divulga el uso del vector o plásmido para la liberación de un polinucleótido heterólogo que codifica una proteína del factor C heteróloga de un cangrejo herradura en una célula huésped protozoo de la presente invención. La administración puede ser la transfección de la célula huésped protozoo.

- 5 El alcance de la presente divulgación abarca el uso del vector o plásmido divulgado en el presente documento en cualquier sistema de expresión descrito en el presente documento.

La transfección de la especie de la célula huésped puede realizarse usando cantidades de ADN que oscilan entre 1-100 µg. La selección se puede realizar con técnicas de siembra y condiciones adecuadas para la selección de
10 antibióticos, o mediante el uso de cualquier técnica de dilución. La eficacia de la transfección varía ampliamente según la especie elegida, siendo la más alta para especies de *Leishmania*.

En diversas realizaciones, una sola célula puede contener y/o mantener varias construcciones de expresión. Preferentemente, todas las diversas construcciones de expresión llevan diferentes marcadores de selección. Los
15 niveles de expresión varían significativamente dependiendo del huésped y la construcción elegida, con los plásmidos episomales en el extremo inferior de la escala, pero capaces de generar proteína recombinante hasta en un 1 % de la proteína celular total.

Los resultados experimentales proporcionados en el presente documento muestran claramente que una célula
20 huésped de tripanosoma cinetoplastídico es capaz de expresar una proteína del factor C del cangrejo herradura heteróloga y recombinante, que puede activarse por endotoxina, quimotripsina o lípido A para convertirse en una enzima activa. Se entiende que esta capacidad no se limita a miembros del orden Trypanosomatida (tripanosomas cinetoplastídicos), sino que es una característica del protozoo parásito cinetoplastídico en su conjunto. Los expertos en la materia reconocerán que el tripanosoma cinetoplastídico distinto de los miembros del género *Leishmania* también
25 se puede usar para la expresión recombinante del factor C heterólogo.

En diversas realizaciones, el vector o plásmido comprende además una secuencia de ácido nucleico que codifica una o más proteínas para fusionarse con la proteína del factor C producida por un método de la presente invención. Estas realizaciones proporcionan la producción de proteínas de fusión o proteínas quiméricas de la proteína del
30 factor C mediante los métodos de la presente invención.

El alcance de la presente invención abarca vectores y plásmidos, que comprenden una o más secuencias de ácido nucleico, que codifican una o más proteínas del factor C recombinantes de cangrejo herradura.

35 *Métodos para producir el factor C*

La presente invención proporciona un método para producir el factor C a partir de un cangrejo herradura, comprendiendo el método las etapas de (a) cultivar células de un protozoo parásito de la presente invención en condiciones tales que las células del protozoo parásito expresan el factor C codificado por el polinucleótido y (b)
40 recuperar el factor C producido en la etapa (a) del cultivo celular. Las células usadas en los métodos para producir el factor C de cangrejo herradura de acuerdo con la presente invención son células huésped como se describe en el presente documento. Por lo tanto, está claro que las células huésped usadas en los métodos para producir factor C de cangrejo herradura de acuerdo con la presente invención comprenden un polinucleótido que codifica factor C de cangrejo herradura como se describe en el presente documento.

En diversas realizaciones, el método para producir factor C de cangrejo herradura de acuerdo con la presente invención comprende una etapa de transfección de una célula huésped de protozoo parásito con un vector o plásmido de la presente invención. Obviamente, dicha etapa precede a la etapa de cultivo de la célula huésped en condiciones tales que se expresa el factor C recombinante. Preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito
50 es una célula huésped de protozoo parásito de cinetoplastídico. Más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es un tripanosomátido digenético (es decir, un miembro digenético del orden Trypanosomatida). Aún más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del orden Trypanosomatida. Incluso más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del género *Leishmania*. Lo más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es *Leishmania tarentolae*.

En diversas realizaciones, el método para producir proteína del factor C de cangrejo herradura en una célula huésped o sistema de expresión de acuerdo con la presente invención comprende cultivar una célula huésped transfectada estable de la presente en un medio de selección para la expresión constitutiva del gen heterólogo, donde la célula huésped transfectada estable comprende (a) una secuencia de ADN que codifica un gen de un
60 marcador seleccionable y (b) una secuencia de ADN heterólogo que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura operativamente unida e integrada en el gen transcrito activamente.

En diversas realizaciones, el método para producir proteína del factor C de cangrejo herradura en una célula huésped o sistema de expresión de acuerdo con la presente invención comprende cultivar una célula huésped transfectada estable de la presente en un medio de selección para la expresión constitutiva del gen heterólogo, donde la célula huésped transfectada estable comprende (A) una secuencia de ADN que codifica un gen de un
65

marcador seleccionable y (b) una secuencia de ADN heterólogo que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura operativamente unida a un ADN plasmídico mantenido episómicamente con un promotor activo.

5 En diversas realizaciones, el método para producir proteína del factor C de cangrejo herradura en una célula huésped o sistema de expresión de acuerdo con la presente invención comprende cultivar una célula huésped transfectada estable del presente documento, donde la célula huésped transfectada estable comprende: (a) una secuencia de ADN que codifica una ARN polimerasa heteróloga, integrada en un grupo de genes transcritos activamente, (b) (una secuencia de ADN que codifica un marcador seleccionable integrado en un grupo de genes transcritos activamente, (c) una secuencia de ADN que codifica un gen represor de la transcripción integrado en un grupo de genes transcritos de forma activa y (d) una secuencia de ADN heteróloga que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura precedida por el promotor de la ARN polimerasa heteróloga y un elemento sensible al represor, y donde la célula huésped transfectada estable se cultiva con un marcador seleccionable y la expresión del gen heterólogo se induce con un inhibidor del represor heterólogo.

15 El alcance de la presente invención abarca realizaciones del método para producir el factor C según la presente invención, donde el factor C recombinante de cangrejo herradura se acumula dentro de la célula huésped. El alcance de la presente invención también abarca realizaciones del método para producir el factor C según la presente invención, donde el factor C recombinante de cangrejo herradura se acumula en el medio de cultivo celular debido a la secreción de la proteína expresada. Por lo tanto, en diversas realizaciones, la etapa de recuperar el factor C producido en la etapa (a) del cultivo celular significa recuperar el factor C de las células huésped, donde la proteína del factor C expresado se acumula. La recuperación del factor C de las células huésped, en las que se acumula la proteína del factor C, incluye, aunque no de forma limitativa, una etapa de lisis de las células huésped. Las técnicas de ejemplo para la lisis celular incluyen, aunque no de forma limitativa, ultrasonidos, prensa francesa y lisis enzimática. La recuperación del factor C de las células huésped, en las que se acumula la proteína del factor C, puede incluir una etapa separada de extracción de la proteína del factor C expresada después de la lisis de la célula huésped.

30 En varias otras realizaciones, la etapa de recuperar el factor C producido en la etapa (a) del cultivo celular significa recuperar el factor C del medio de cultivo celular, donde el factor C se acumula en el medio de cultivo celular debido a la secreción de la proteína expresada. La recuperación del factor C del medio de cultivo celular, donde la proteína del factor C se acumula debido a la secreción de la proteína expresada, puede incluir además una etapa separada de extracción de la proteína del factor C expresada después del medio de cultivo celular.

35 En diversas realizaciones, la etapa de recuperar el factor C producido en la etapa (a) del cultivo celular significa recuperar el factor C de las células huésped y el medio de cultivo celular al mismo tiempo. En el presente documento, la etapa de recuperar el factor C incluye, aunque no de forma limitativa, una etapa de lisis de las células huésped.

40 En diversas realizaciones, la etapa de recuperar la proteína del factor C descrita anteriormente se puede considerar como una etapa de aislamiento de la proteína del factor C del cultivo celular, en particular de las células huésped y el medio de cultivo celular, respectivamente.

45 En diversas realizaciones, el factor C obtenido directamente a partir de un método de acuerdo con la presente invención se puede considerar como factor C purificado, que es directamente aplicable para la detección de endotoxinas y/o la eliminación de endotoxinas. Sin embargo, en diversas realizaciones, el método para producir el factor C de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa separada de purificación del factor C obtenido directamente del proceso de producción. Preferentemente, el método para producir el factor C de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa de purificación del factor C por medios cromatográficos. Los ejemplos de medios cromatográficos incluyen, aunque no de forma limitativa, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía en fase inversa y cromatografía de afinidad. Claramente, dicha etapa separada de purificación de la proteína del factor C por medios cromatográficos sigue cualquier etapa de recuperación/aislamiento de la proteína del factor C como se ha descrito anteriormente.

55 En diversas realizaciones, el método para producir el factor C de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa de concentración y/o estabilización de la proteína del factor C obtenida después de la recuperación de la proteína del factor C. En diversas realizaciones, el método para producir el factor C de acuerdo con la presente invención puede comprender una etapa de concentración y/o estabilización de la proteína del factor C obtenida después de la purificación de la proteína del factor C por medios cromatográficos. La etapa de estabilización de la proteína del factor C puede incluir el uso de un agente estabilizante de proteínas. Entre los ejemplos de agentes estabilizantes de proteínas se incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes reductores, concentraciones altas de sales monovalentes o bivalentes, aditivos hidrofóbicos, aditivos anfífilicos y glicerol. En diversas realizaciones, la etapa de concentrar la proteína del factor C incluye la concentración del sobrenadante del cultivo resultante del proceso de producción, *es decir*, la etapa de concentración se realiza antes de la etapa de recuperación/aislamiento como se ha descrito anteriormente. En varias otras realizaciones, la etapa de concentrar la proteína del factor C incluye la concentración de la solución de la proteína del factor C, que se obtiene después de realizar la etapa de recuperación/aislamiento de la proteína del factor C como se ha descrito en el presente

documento anteriormente, *es decir*, la etapa de concentración se realiza DESPUÉS de la etapa de recuperación/aislamiento como se ha descrito anteriormente. Los medios y métodos para concentrar la proteína del factor C incluyen, aunque no de forma limitativa, filtración, captura cromatográfica y elución, y liofilización.

- 5 Se ha demostrado que la proteína del factor C de cangrejo herradura producida por un método de la presente invención es enzimáticamente activa tras la unión a endotoxina o quimotripsina, tal como se describe en el ejemplo 4. El hecho de que el factor C así producido retenga la bioactividad de tener la actividad enzimática de tipo factor C es un rasgo técnico característico del factor C recombinante proporcionado por la presente invención debido a que muchos intentos en la técnica de producir factor C enzimáticamente activo en varias células huésped han fallado, como se ha tratado anteriormente en el presente documento. Los presentes inventores han descubierto sorprendentemente que la producción recombinante de factor C de cangrejos herradura en una célula huésped protozoo proporciona una proteína del factor C, que es enzimáticamente activa tras la activación por endotoxina (o quimotripsina o lípido A). Esto no podría haberse esperado de las enseñanzas de la técnica anterior, según las cuales la producción de la proteína del factor C enzimáticamente activa en procariotas y eucariotas inferiores no proporcionó un Factor enzimáticamente activo, y según el cual se deberían usar sistemas de expresión eucariotas superiores para producir rFC con actividad biológica completa en lugar de un sistema de expresión procariota o eucariota simple como levadura. Como se describe en la sección Antecedentes, el uso exitoso de células de insecto ha llevado a esta enseñanza, en relación con el conocimiento de que las células de insecto se parecen más a las células del cangrejo herradura que las células de levadura en su fisiología y bioquímica. Por lo tanto, se consideró en la técnica que el factor C recombinante se debe producir en las células, que se asemejan más a la proteína purificada de su fuente natural, *es decir*, cangrejos de herradura, y retienen la bioactividad de tener actividad de serina proteasa después de ser activados por endotoxina.

- 25 El alcance de la presente invención abarca la producción de factor C recombinante de cangrejo herradura en cultivos en fermentador basándose en los medios y métodos para producir factor C recombinante descritos en el presente documento. El alcance de la presente invención también abarca una producción de fermentación del factor C recombinante de cangrejo herradura a escala industrial basada en los medios y métodos para producir el factor C recombinante descrito en el presente documento. El alcance de la presente invención abarca el uso de cualquier tipo de fermentador, incluyendo fermentadores a escala de laboratorio y fermentadores a escala industrial. En la producción de fermentación de acuerdo con la presente invención, la concentración de, *entre otros*, la (s) fuente (s) de carbono se controlan preferentemente durante el cultivo hasta una concentración tal que sustancialmente no se producen efectos adversos sobre la productividad de la proteína del factor C recombinante.

Factor C producido mediante métodos de la presente invención

- 35 El factor C producido por un método de la presente invención abarca la proteína del factor C que tiene la secuencia de aminoácidos del factor C tal como se encuentra en su fuente natural, *es decir*, como se puede obtener a partir de cangrejos herradura, así como a sus variantes como se describe en el presente documento. De manera similar, el factor C producido por un método de la presente invención abarca la proteína del factor C codificada por una secuencia de ácido nucleico, que es idéntica a la secuencia de ácido nucleico que codifica el Factor C tal como se encuentra en su fuente natural, *es decir*, como se puede obtener a partir de cangrejos herradura, así como a sus variantes como se describe en el presente documento. En cualquier caso, la proteína del factor C producida mediante un método de la presente invención muestra actividad enzimática de tipo factor C al activarse con endotoxina (o quimotripsina o lípido A).

- 45 En la presente invención, la expresión "Factor C producido por un método de la presente invención" abarca "Factor C obtenido (u obtenible) a partir de un método de la presente invención". Dichos términos pueden usarse indistintamente.

- 50 La producción del factor C de cangrejo herradura en una célula huésped protozoo, en particular en una célula huésped tripanosomático (es decir, una célula huésped del orden Trypanosomatida) ilustrada por las células del género *Leishmania*, proporciona una glucosilación específica del factor C, que es diferente del patrón de glucosilación proporcionado por la expresión del factor C en organismos procariotas, levaduras y sistemas de expresión de eucariotas superiores, como células de insecto. Por lo tanto, el factor C obtenido a partir del método de la presente invención es estructuralmente diferente de la proteína del factor C obtenida a partir de los métodos descritos en la técnica. Por lo tanto, el método para producir el factor C proporcionado por la presente invención proporciona un producto, *es decir*, factor C recombinante, que, como tal, es nuevo sobre el factor C descrito en la técnica anterior. La presente invención proporciona, por tanto, una nueva proteína del factor C, que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras y que se puede obtener mediante un método para producir el Factor C de cangrejo herradura según la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, una expresión equivalente para "obtenible" se representa mediante los términos "obtenido" u "obtenido directamente".

- 65 Preferentemente, el factor C producido mediante un método de la presente invención tiene la secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor C de *Tachypleus tridentatus*,

más preferentemente, el Factor C producido por un método de la presente invención comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. La producción recombinante de factor C de *Tachypleus tridentatus* no se ha descrito anteriormente. En particular, la producción del factor C de *achypleus tridentatus* en un huésped protozoo parásito, específicamente en una célula huésped tripanosomático (es decir, una célula huésped del orden Trypanosomatida) ilustrada por las células del género *Leishmania*, no se ha descrito anteriormente.

La proteína del factor C recombinante de la presente invención se puede aislar y purificar a partir de una célula huésped protozoo de la presente invención que contiene o expresa la proteína del factor C recombinante mediante técnicas conocidas en la materia, que incluyen, aunque no de forma limitativa, lisis, cromatografía, filtración y centrifugación. Lo mismo se aplica con respecto al aislamiento y la purificación del factor C recombinante de la presente invención a partir del medio de cultivo celular en caso de que la proteína expresada se secrete y se acumule en el medio de cultivo celular. Tal como se ha explicado anteriormente en el presente documento, en diversas realizaciones, el factor C obtenido directamente a partir de un método de la presente invención se puede considerar como factor C purificado, es decir, sin la aplicación de purificación específica del Factor C por medios cromatográficos. En particular, para ciertas aplicaciones del factor C, la proteína puede aislarse de la célula huésped (en caso de que la proteína del factor C se acumule intracelularmente) o del medio de cultivo celular (en caso de que la proteína del factor C se secrete en el medio de cultivo celular) sin realizar una etapa de purificación separada que implica medios cromatográficos. En diversas realizaciones, incluso el medio de cultivo celular que contiene la proteína del factor C secretada y acumulada puede usarse para ciertas aplicaciones de detección de endotoxinas o eliminación de endotoxinas. El alcance de la presente invención abarca el uso del medio de cultivo celular que contiene el Factor C, donde el medio de cultivo celular se ha concentrado y/o la proteína del factor C en el medio de cultivo celular se ha estabilizado antes de la aplicación del medio de cultivo celular. Los medios y métodos para concentrar el medio de cultivo celular incluyen, aunque no de forma limitativa, filtración, captura cromatográfica y elución, y liofilización. Adicionalmente, la proteína del factor C contenida en el medio de cultivo celular puede incluir el uso de un agente estabilizante de proteínas. Entre los ejemplos de agentes estabilizantes de proteínas se incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes reductores, concentraciones altas de sales monovalentes y bivalentes, aditivos hidrófobos, aditivos anfífilos y glicerol.

En diversas realizaciones, la proteína del factor C recombinante aislada y/o purificada producida por la presente invención está marcada. Preferentemente, el marcador se selecciona del grupo que consiste en un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador fluorescente y biotina.

También está abarcado por la presente invención el factor C recombinante producido por un método de la presente invención, que se combina con parte o partes del dominio constante de una inmunoglobulina (IgG), dando como resultado un Factor C quimérico proporcionado por la presente invención. Estas proteínas de fusión pueden facilitar el aislamiento y/o la purificación del Factor C proporcionado según los métodos de la presente invención.

El alcance de la presente invención abarca proteínas de fusión del factor C recombinante, que se puede producir mediante métodos para producir proteína del factor C de la presente invención.

La presente invención proporciona adicionalmente proteínas quiméricas que comprenden el factor C producido de acuerdo con un método de la presente invención y una o más proteínas heterólogas.

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, el Factor C recombinante de la presente invención se produce como un zimógeno (o proenzima), que es inducible por la presencia de niveles traza de endotoxina. Específicamente, el Factor C obtenido mediante un método de la presente invención se convierte (auto)catalíticamente en su forma activa en presencia de endotoxina. El factor C producido mediante un método de la presente invención se puede proteger de la activación por endotoxina y escisión autocatalítica de la cadena L al poner en contacto el factor C producido con un agente estabilizante similar, por ejemplo, DMSO, 2-propanol, o inhibidores de proteasa y, opcionalmente, un agente quelante. Si la proteína del factor C tras la expresión se acumula intracelularmente dentro de una célula huésped protozoo de acuerdo con la presente invención, dicho contacto puede realizarse lisando las células huésped en presencia de DMSO y, opcionalmente, un agente quelante. Si la proteína del factor C de la presente invención se secreta en el medio de cultivo celular, dicho contacto puede realizarse añadiendo DMSO y, opcionalmente, un agente quelante, al medio de cultivo celular antes de aislar y/o purificar adicionalmente la proteína del factor C. Por supuesto, en diversas realizaciones, dicho contacto puede realizarse añadiendo DMSO y, opcionalmente, un agente quelante, al medio de cultivo celular después de aislar y/o purificar adicionalmente la proteína del factor C. Básicamente, se puede agregar DMSO a las soluciones que se utilizan durante el proceso de aislamiento y/o purificación. Incluso una mayor protección del factor C producido mediante un método de acuerdo con la presente invención se consigue añadiendo también a la solución de aislamiento/purificación un agente eficaz para quelar los iones metálicos divalentes.

En diversas realizaciones, la proteína del factor C de la presente invención se acumula intracelularmente dentro de una célula huésped protozoo de acuerdo con la presente invención. En varias otras realizaciones, la proteína del factor C de la presente invención se acumula en el medio de cultivo celular del cultivo de células huésped protozoo de acuerdo con la presente invención. La acumulación de la proteína del factor C en el medio de cultivo celular normalmente se debe a la secreción de la proteína expresada. Sin embargo, el alcance de la presente invención

abarca también realizaciones, en las que la acumulación de la proteína del factor C en el medio de cultivo celular normalmente se debe a la lisis de las células huésped, donde la proteína del factor C se acumuló primero intracelularmente. Las técnicas de ejemplo para la lisis celular realizadas después de la expresión y la acumulación intracelular de la proteína del factor C incluyen, aunque no de forma limitativa, ultrasonidos, prensa francesa y lisis enzimática.

Los marcadores de afinidad se fijan a las proteínas para que puedan purificarse de su fuente biológica en bruto usando una técnica de afinidad. El alcance de la presente invención abarca el Factor C producido mediante un método de la presente invención, donde el Factor C producido comprende un marcador de afinidad para la purificación. Dichos marcadores de purificación incluyen, aunque no de forma limitativa, marcadores de aminoácidos y peptídicos HIS, CBP, CYD (péptido NorpD covalente aunque disociable), Strep II, FLAG, y HPC (cadena pesada de la proteína C, así como los sistemas marcadores de fusión proteica GST y MBP.

La presente invención también comprende la proteína del factor C producida por la presente invención que lleva un marcador químico. Un ejemplo de marcador químico es la biotina, que proporciona la purificación mediante unión estrecha a estreptavidina-agarosa o estreptavidina-perlas. La biotilación del factor C de la presente invención también incluye el factor C biotinilado para la inmovilización del factor C sobre las superficies. El marcador biotina puede usarse en cromatografía de afinidad con una columna que tiene avidina (también estreptavidina o neutravidina) unida a ella. El marcador biotina también se puede usar para la detección de factor C a través de anticuerpos anti-biotina o estrategias de detección marcadas con avidina/estreptavidina, tales como los indicadores de enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina) o sondas fluorescentes. Esto puede ser útil en métodos inmunoanalíticos que incluyen, aunque no de forma limitativa, ensayos ELISA.

Factor C purificado

Como se describe en el presente documento, la presente invención proporciona el factor C que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina mediante SDS-PAGE en condiciones no reductoras producidas por un método de acuerdo con la presente invención. El Factor C obtenido a partir de un método según la presente invención se puede aplicar directamente a métodos para la detección de endotoxinas o la eliminación de endotoxinas sin ninguna purificación por separado por medios cromatográficos. Por lo tanto, como se describe en el presente documento ya en otra parte, el factor C obtenido directamente a partir de un método de acuerdo con la presente invención se puede considerar, por tanto, factor C purificado. La presente invención también abarca el Factor C, que se purifica adicionalmente mediante medios cromatográficos, es decir, el Factor C producido por un método según la presente invención u obtenido directamente a partir de un método de acuerdo con la presente invención se purifica adicionalmente por medios cromatográficos. La aplicación de medios cromatográficos incluye, aunque no de forma limitativa, cromatografía de intercambio iónico, filtración en gel, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en fase inversa y cromatografía de afinidad.

En diversas realizaciones, el factor C purificado de acuerdo con la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, el factor C aislado, concentrado y/o estabilizado. El Factor C aislado incluye, aunque no de forma limitativa, el Factor C aislado a partir del cultivo celular o del medio de cultivo celular obtenido del cultivo de una célula huésped protozoo para producir el factor C de acuerdo con la presente invención. El Factor C concentrado incluye, aunque no de forma limitativa, el factor C concentrado a partir del cultivo celular o del medio de cultivo celular obtenido del cultivo de una célula huésped protozoo para producir el factor C de acuerdo con la presente invención. Los medios y métodos para concentrar el Factor en consecuencia incluyen, aunque no de forma limitativa, filtración, captura cromatográfica y elución, y liofilización. El Factor C estabilizado incluye, aunque no de forma limitativa, el factor C estabilizado por un agente estabilizante de proteína. Entre los ejemplos de agentes estabilizantes de proteínas se incluyen, aunque no de forma limitativa, agentes reductores, concentraciones altas de sales monovalentes y bivalentes, aditivos hidrófobos, aditivos anfifílicos y glicerol.

En diversas realizaciones, el factor C purificado de acuerdo con la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, el factor C purificado de manera intermedia, que significa Factor C, que se purifica a partir de la mayoría de las impurezas en masa, tales como otras proteínas y ácidos nucleicos.

En diversas realizaciones, el factor C purificado de acuerdo con la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, factor C de alta pureza, que significa factor C purificado a partir de cualquier resto de impurezas traza o sustancias estrechamente relacionadas.

En diversas realizaciones, el factor C proporcionado por la presente invención, o producido por un método de la presente invención, tiene una pureza de al menos el 75 % o al menos el 80 %, es decir, el factor C constituye al menos el 75 % o al menos el 80 % de la proteína total. En diversas realizaciones, el factor C proporcionado por la presente invención, o producido por un método de la presente invención, tiene una pureza de al menos el 85% o al menos el 90%, es decir, el factor C constituye al menos el 85 % o al menos el 90 % de la proteína total. En diversas realizaciones, el factor C proporcionado por la presente invención, o producido por un método de la presente invención, tiene una pureza de al menos el 95% o al menos el 96%, es decir, el factor C constituye al menos el 95% o al menos el 96% de la proteína total. En diversas realizaciones, el factor C proporcionado por la presente

invención, o producido por un método de la presente invención, tiene una pureza de al menos el 97% o al menos el 98%, *es decir*, el factor C constituye al menos el 97% o al menos el 98% de la proteína total. En diversas realizaciones, el factor C proporcionado por la presente invención, o producido por un método de la presente invención, tiene una pureza de al menos el 99% o incluso el 100%, *es decir*, el factor C constituye al menos el 99 % o al menos el 100 % de la proteína total.

Anticuerpos

También se describe en el presente documento un anticuerpo o fragmento del mismo que se une específicamente a una proteína del factor C de cangrejo herradura o fragmento de la misma proporcionada por la presente invención u obtenida de un método de la presente invención. El anticuerpo se puede unir específicamente al factor C de cangrejo herradura de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 4.

El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo quimérico, un fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂ o un fragmento scFv. El anticuerpo divulgado en el presente documento puede marcarse. El marcador puede ser un marcador enzimático, un radioisótopo, un marcador fluorescente o biotina. La proteína del factor C de cangrejo herradura de la presente invención se puede usar para producir anticuerpos policlonales y monoclonales. Los anticuerpos se pueden preparar mediante cualquiera de una variedad de métodos disponibles en la técnica y conocidos por los expertos en la técnica. Los fragmentos de anticuerpos divulgados en el presente documento, ya sea unidos a otras secuencias o no, también pueden incluir inserciones, deleciones, sustituciones u otras modificaciones seleccionadas de regiones particulares o restos de aminoácidos específicos, con la condición de que la actividad del fragmento de anticuerpo no se altere o deteriore significativamente. Comparado con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo no modificado. Estas modificaciones pueden proporcionar alguna propiedad adicional, tal como eliminar/agregar aminoácidos capaces de formar puentes disulfuro. En cualquier caso, los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la presente invención deben poseer una propiedad bioactiva, tal como unión específica a su antígeno afín.

Las regiones funcionales o activas de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden identificarse por mutagénesis de una región específica de la proteína, seguido de expresión y prueba del polipéptido expresado. Dichos métodos son fácilmente evidentes para un experto en la técnica y pueden incluir mutagénesis específica de sitio del ácido nucleico que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Composiciones y soluciones

En el presente documento se divulgan composiciones que comprenden proteína del factor C recombinante de cangrejo herradura producida de acuerdo con un método de la presente invención. En el presente documento también se divulga una composición que comprende un polinucleótido o molécula de ácido nucleico como se divulga en el presente documento. En el presente documento también se divulga una composición que comprende un vector o plásmido como se divulga en el presente documento. En el presente documento se divulga adicionalmente una composición que comprende una célula huésped de protozoo parásito de acuerdo con la presente invención. En el presente documento se divulga adicionalmente una composición que comprende una proteína de fusión o una proteína quimérica de acuerdo con la presente invención.

Una composición de acuerdo con la presente divulgación puede ser una composición de diagnóstico.

Una composición de acuerdo con la presente divulgación puede ser una composición para detectar endotoxina, específicamente para detectar endotoxina en una muestra. En varios aspectos, la muestra es una muestra ambiental. En varios aspectos, la muestra es una muestra biológica. En diversas realizaciones, la muestra es una muestra de prueba, específicamente una muestra de prueba biológica o ambiental. Específicamente, la muestra biológica o la muestra de prueba biológica es una muestra biológica o muestra de prueba biológica obtenida de un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. El alcance de la presente invención abarca la detección de endotoxinas en una muestra obtenida de animales que incluyen, aunque no de forma limitativa, perros, gatos, cerdos, caballos, aves y reptiles.

En el presente documento se divulgan soluciones, específicamente soluciones de diagnóstico, que comprenden la proteína del factor C recombinante de la presente invención. En el presente documento también se divulgan soluciones para eliminar la endotoxina que comprende el factor C recombinante producido de acuerdo con un método de la presente invención.

En diversas realizaciones, el factor C de cangrejo herradura producido mediante un método de acuerdo con la presente invención u obtenido de un método de la presente invención se puede designar como un agente para medir/detectar endotoxina (agente de detección/medición de endotoxina). En diversas realizaciones, el Factor C de cangrejo herradura producido mediante un método de acuerdo con la presente invención u obtenido de un método de la presente invención se puede designar como un agente para eliminar endotoxina (agente eliminador de endotoxina).

Las composiciones y soluciones divulgadas en el presente documento, que comprenden el factor C de cangrejo herradura de la presente invención, pueden comprender además un componente distinto del Factor C recombinante producido por un método de la presente invención. En particular, el agente puede comprender además un sustrato de Factor C para la detección, siempre que el agente pueda usarse para la medición/detección de endotoxina.

Las composiciones y soluciones que contienen factor C divulgadas en el presente documento también pueden comprender, *por ejemplo*, un agente tampón del pH y/o una sal, preferentemente una sal quelante. Los ejemplos de agentes tamponadores de pH incluyen, aunque no de forma limitativa, tampón HEPES, tampón MES y tampón Tris. Los disolventes orgánicos tales como alcoholes, ésteres, cetonas y amidas también pueden estar comprendidas en las composiciones y soluciones divulgadas en el presente documento.

El agente de detección/medición de endotoxina y/o el agente de eliminación de endotoxina de la presente divulgación se pueden formular en una forma arbitraria que incluye, aunque no de forma limitativa, una forma sólida, una forma líquida y una forma de gel. Se pueden usar aditivos como vehículos de formulación, incluyendo, aunque no de forma limitativa, vehículos, aglutinantes, disgregantes, lubricantes, estabilizantes, correctores y diluyentes y disolventes.

En varios aspectos, las composiciones y soluciones de la presente divulgación, que comprenden el factor C de cangrejo herradura recombinante de la presente invención, pueden comprender además un tensioactivo. Por lo tanto, en el presente documento se divulga un reactivo para detectar endotoxina, que comprende una proteína del factor C de cangrejo herradura producida de acuerdo con un método de la presente invención u obtenida de un método de la presente invención, y un agente tensioactivo. En varios aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo anfótero. En varios otros aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo aniónico o un tensioactivo catiónico. En varios otros aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. Especialmente, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ZWITTERGENT 3-14, Triton X-100, Triton X-114, octil-beta-D-tioglucoído, Genapol C-100, Tween 20 y Tween 80. Específicamente, el tensioactivo está presente en una composición o solución divulgada en el presente documento a una concentración de 0,001 a 0,5 %, más específicamente a una concentración de 0,001 a 0,025 %, aún más específicamente a una concentración de 0,001 a 0,01 %. En varios aspectos, el tensioactivo está presente en una composición o solución divulgada en el presente documento a una concentración de 0,004 a 0,006 %.

La proteína de Factor C de cangrejo herradura de la presente invención puede usarse para medir/detectar endotoxina como tal o puede usarse después de diluir, dispersar o disolver en agua, solución salina fisiológica, tampón o similares. "Proteína del factor C como tal" abarca cualquier forma de proteína del factor C obtenida directamente de un método de la presente invención, incluyendo factor C aislado, concentrado y/o purificado obtenido de un método de la presente invención. El alcance de la presente invención también abarca "proteína del factor C como tal" obtenida después de purificarse por medios cromatográficos. Tales realizaciones están dentro del alcance de la presente invención.

Métodos para la detección de endotoxina

El factor C recombinante proporcionado por la presente invención forma la base de un ensayo de diagnóstico de endotoxina para cribados de alto rendimiento de endotoxina. El factor C zimógeno recombinante activado por endotoxina hidroliza catalíticamente los sustratos sintéticos para formar productos medibles, cuantificando así la endotoxina.

La presente invención proporciona el uso de proteína del factor C de cangrejo herradura producida mediante métodos para producir el factor C de acuerdo con la presente invención en un método para la detección de endotoxina, donde la proteína del factor C producida exhibe actividad de serina proteasa al unirse a la endotoxina. En diversas realizaciones, el factor C de cangrejo herradura de la presente invención se usa en un método para detección de endotoxina que comprende poner en contacto una muestra, preferentemente una muestra de prueba, para analizar la presencia de endotoxina (LPS) o lípido A con factor C de herradura de herradura recombinante. según la invención, y medir la actividad enzimática (es decir, actividad de serina proteasa) del factor C recombinante. La actividad enzimática del factor C recombinante refleja su activación debido a la unión de endotoxina o lípido A, o de otra endotoxina conocida en la técnica para unirse al factor C de un cangrejo herradura. La actividad enzimática del factor C (en particular la actividad de serina proteasa) se mide convenientemente por cualquier método conocido en la técnica, pero se mide preferentemente mediante un método cromogénico o fluorogénico. Tales métodos comprenden medir la formación de un producto, que resulta de la escisión de un sustrato del factor C por la actividad proteasa del Factor C recombinante. La medición se basa en un cambio de color (en el caso de un sustrato cromogénico) o emisión de fluorescencia (en el caso de un sustrato fluorogénico) resultante de la escisión del sustrato. El alcance de la presente invención abarca el uso de sustratos de factor C cromogénicos y fluorogénicos, que incluyen, aunque no de forma limitativa, sustratos de peptidil-pNA cromogénicos y sustratos de peptidil-AMC, peptidil-AFC y peptidil-MCA fluorogénicos. Los sustratos preferentes para dicho ensayo cromogénico o fluorogénico son N-t-Boc-VPR-MCA, N-t-Boc-VPR-AMC, Mu-VPR-AFC y Boc-VPR-pNA.

Otros aspectos de la presente divulgación incluyen métodos inmunológicos para analizar la presencia de endotoxina

o lípido A en una muestra, preferentemente una muestra de prueba. Estos métodos se basan en la unión específica de un anticuerpo al factor C recombinante, seguido de la detección y/o cuantificación del complejo del factor C-anticuerpo. La muestra que se va a analizar se puede poner en contacto con un anticuerpo inmovilizado que se une específicamente a la endotoxina o al lípido A. El ligando inmovilizado (es decir, la endotoxina o el lípido A inmovilizado) se pone luego en contacto con el factor C recombinante de acuerdo con la presente invención, dando como resultado un factor C recombinante (rFC) inmovilizado. A continuación, el rFC inmovilizado se pone en contacto con un segundo anticuerpo que se une específicamente al rFC inmovilizado. La presencia y/o la cantidad del complejo inmovilizado, que comprende el rFC unido al segundo anticuerpo, se puede determinar mediante cualquier técnica conocida en la materia, *por ejemplo*, mediante la aplicación de un tercer anticuerpo que se une específicamente al segundo anticuerpo, *por ejemplo*, a través de la porción Fc del anticuerpo. En una realización alternativa, en lugar de aplicar el segundo anticuerpo, se mide la actividad enzimática del rFC inmovilizado.

En otro aspecto de la presente divulgación, la unión específica de endotoxina o lípido A a rFC de la presente invención se emplea en ensayos disponibles en el mercado, *por ejemplo*, el ensayo BIACORE™ (Pharmacia Biotech). Inmovilizando el rFC en la placa de sustrato de tales aparatos, puede detectarse la presencia de endotoxina o lípido A en una muestra. El experto en la materia es capaz de optimizar la cantidad de rFC a inmovilizar para una carga dada de endotoxina en una muestra.

En varios aspectos, el método para detectar endotoxina se realiza en una muestra de prueba, específicamente una muestra de prueba obtenida de un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. El alcance de la presente divulgación también abarca la detección de endotoxinas en una muestra obtenida de animales, que incluyen, aunque no de forma limitativa, perros, gatos, cerdos, caballos, aves y reptiles.

En varios aspectos, el método para la detección de endotoxina comprende el uso de un soporte sólido pre-recubierto selectivo para endotoxina. En particular, la captura selectiva de endotoxina (LPS) se logra usando una proteína receptora derivada de fago que está dirigida a la parte central interna (es decir, el oligosacárido central interno) o la parte de lípido A del LPS. La estructura central interna del LPS, junto con la parte de lípido A, es una estructura altamente conservada. La estructura central externa es ligeramente variable y el O-antígeno es altamente heterogéneo. La proteína receptora derivada de fago que se utilizará puede exhibir alta afinidad y alta especificidad para las regiones conservadas de la endotoxina. Las regiones altamente conservadas de la endotoxina unidas por dicha proteína receptora derivada de fago abarcan tanto la región central como el lípido A. Por lo tanto, dicha proteína receptora derivada de fago se une a la región central interna (es decir, el oligosacárido central interno) y/o el lípido A. En varios aspectos, dicha proteína receptora derivada de fago es una proteína de la cola del bacteriófago, una proteína de la cabeza del bacteriófago de un bacteriófago con cola, o una proteína de la cubierta del bacteriófago de un bacteriófago sin cola. Específicamente, dicha proteína receptora derivada de fago puede ser una proteína de la cola del bacteriófago. Específicamente, la proteína de la cola del bacteriófago puede ser una proteína de la fibra de la cola del bacteriófago corto. En varios aspectos, la fibra de la cola del bacteriófago corto se selecciona de K3, T2, T4, Ox2, RB32-33, AR1, PP01 y RB69. En varios aspectos, la proteína de la cola del bacteriófago se modifica para la detección de endotoxina de acuerdo con la presente invención. En diversas realizaciones, la proteína de la cola del bacteriófago puede acoplarse a una proteína activa.

Después de la unión de la endotoxina de muestra (LPS) al soporte sólido prerrecubierto con dicha proteína receptora derivada de fago, la matriz de muestra original se elimina por lavado, eliminando así los componentes que potencialmente interfieren con la reacción de detección. Posteriormente, la endotoxina se detecta mediante el factor C de cangrejo herradura de la presente invención en un proceso, que incluye la reacción del factor C con un sustrato del factor C. En varios aspectos, el sustrato es un sustrato cromogénico o fluorogénico.

En varios aspectos, el soporte sólido que se va recubrir previamente con la proteína receptora derivada de fago es una placa de microtitulación, una perla (por ejemplo, perla de sílice o una perla de polímero orgánico), una lámina o una membrana. Por lo tanto, el método para la detección de endotoxina que incluye el uso de un soporte sólido pre-recubierto selectivo para endotoxina comprende tres etapas: la primera etapa comprende la unión de la endotoxina de muestra (es decir, endotoxina contenida en una muestra) a un soporte sólido, que se recubre previamente con una proteína receptora derivada de fago que exhibe alta afinidad y alta especificidad para la región central conservada de LPS. La primera etapa proporciona la inmovilización de la endotoxina de muestra. La segunda etapa es una etapa de lavado para eliminar por lavado la matriz de la muestra original. La tercera etapa comprende la detección de la endotoxina inmovilizada por una proteína del factor C de cangrejo herradura de la presente invención. La tercera etapa incluye la reacción del factor C con un sustrato para el factor C, que da como resultado una señal detectable. En varios aspectos, el sustrato del factor C de cangrejo herradura se agrega después de que la endotoxina inmovilizada se ha puesto en contacto con la proteína del factor C. En varios aspectos, el sustrato del factor C de cangrejo herradura ya está presente en el ensayo antes de que se agregue la proteína del factor C. El efecto técnico específico de este formato de ensayo de tres etapas es que tiene un intervalo de detección de 0,05 UE/ml hasta 500 UE/ml. Adicionalmente, este formato de ensayo presenta claras ventajas sobre los métodos de detección homogéneos establecidos, que incluyen: menos resultados falsos positivos inducidos por, *por ejemplo*, β -glucano, proteasas o fosfolípidos, menos resultados falsos negativos causados por constituyentes inhibidores de la muestra, menos resultados no válidos que requieren repetir las pruebas, menos interferencia en muestras complejas y, por lo tanto, mayor sensibilidad y amplio rango dinámico.

El formato de ensayo de tres etapas es particularmente útil en la detección de endotoxina en fluidos corporales humanos, tales como sangre, suero y plasma. Específicamente, el ensayo de tres etapas descrito anteriormente es para analizar muestras biológicas clínicas. El ensayo no se aplica directamente en un paciente, sino que en su lugar se aplica en una muestra de prueba obtenida de un paciente.

En el presente documento se divulga un método para detectar endotoxina en una muestra, que comprende las etapas de (i) poner en contacto una muestra para analizar con un agente de detección de endotoxina de la presente invención para formar una mezcla de la muestra de prueba y el agente de detección de endotoxina, (ii) añadir un sustrato de factor C a dicha mezcla, donde la escisión del sustrato del factor C genera una señal detectable y (iii) analizar dicha mezcla en cuanto a la presencia o ausencia de la señal detectable, donde una cantidad de la señal detectable que es el aumento con respecto a una muestra de control que no contiene endotoxina indica la presencia de endotoxina en la muestra de prueba.

En los ensayos de endotoxina proporcionados por la presente invención, el sustrato del Factor C preferentemente es un sustrato de Factor C cromogénico o fluorogénico. En diversas realizaciones, el sustrato del factor C es un sustrato peptidil-pNA cromogénico. En varias otras realizaciones, el sustrato del factor C es un sustrato de peptidil-AMC, peptidil-AFC o peptidil-MCA fluorogénico. Otros sustratos del factor C a modo de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, N-t-Boc-DPR-AMC, N-t-Boc-VPR-AMC, Mu-VPR-AFC y Boc-VPR-pNA. En el presente documento se divulga un método para detectar endotoxina en una muestra, que comprende las etapas de (i) poner en contacto una muestra para analizar con un agente de detección de endotoxina de la presente invención y un sustrato de factor C para formar una mezcla de la muestra de prueba, el agente de detección de endotoxina y el sustrato del Factor C, donde la escisión del sustrato del factor C genera una señal detectable y (ii) analizar dicha mezcla en cuanto a la presencia o ausencia de la señal detectable, donde una cantidad de la señal detectable que es el aumento con respecto a una muestra de control que no contiene endotoxina indica la presencia de endotoxina en la muestra de prueba.

En el presente documento también se divulga un ensayo para endotoxina que comprende: (i) poner en contacto una muestra para analizar con un anticuerpo inmovilizado que se une específicamente a endotoxina (LPS) o que se une específicamente al lípido A, para formar un complejo entre dicho anticuerpo y endotoxina en dicha muestra, (ii) poner en contacto dicho complejo con el factor C recombinante producido por un método de la presente invención para formar un complejo inmovilizado que comprende dicho anticuerpo, endotoxina y factor C recombinante, (iii) poner en contacto dicho complejo inmovilizado de (ii) con un anticuerpo que se une específicamente a dicho Factor C recombinante y (iv) cuantificar la cantidad de dicho anticuerpo unido específicamente a dicho factor C recombinante.

En la presente divulgación, los términos como "método para la detección de endotoxina" o "método para detectar endotoxina" se pueden usar indistintamente con el término "ensayo para endotoxina".

Métodos para eliminar la endotoxina

La presente invención proporciona el uso de proteína del factor C de cangrejo herradura producida por un método de acuerdo con la presente invención en un método para eliminar endotoxina, donde la proteína del factor C producida exhibe actividad de serina proteasa al unirse a la endotoxina. El uso del factor C de la presente invención en dichos métodos incluye, aunque no de forma limitativa, la eliminación de endotoxina del agua, tampones y medios de cultivo celular. Otras diversas realizaciones relacionadas con el uso del factor C de la presente invención en un método para eliminar la endotoxina incluyen, aunque no de forma limitativa, eliminación de la endotoxina de preparaciones biológicas y no biológicas, preferentemente preparaciones biológicas, más preferentemente preparaciones biológicas para estudios en animales, cultivo celular, trasplante, tecnologías de células madre, clasificación de células y otros tratamientos con células de mamíferos. Otras diversas realizaciones relacionadas con el uso del factor C de la presente invención en un método para eliminar la endotoxina incluyen, aunque no de forma limitativa, eliminación de endotoxina de equipos médicos, aparatos médicos, cosméticos, alimentos y bebidas.

El Factor C de la presente invención se puede usar para producir preparaciones libres de endotoxinas, en particular preparaciones biológicas y no biológicas libres de endotoxinas. La presente invención proporciona el uso de Factor C en un método para eliminar la endotoxina (LPS) de preparaciones biológicas de, *por ejemplo*, proteínas, anticuerpos, vacunas, ácidos nucleicos, tampones y/o varias otras sustancias. Preferentemente, una preparación biológica de acuerdo con la presente invención es una preparación biológica líquida, más preferentemente una preparación biológica acuosa. Una preparación biológica acuosa o líquida se puede considerar como una solución biológica líquida o acuosa, o como una composición biológica líquida o acuosa.

En diversas realizaciones de la presente invención, los términos "preparación biológica", "solución biológica" y "composición biológica" pueden usarse indistintamente.

En varios aspectos, el método para eliminar la endotoxina divulgado en el presente documento comprende el uso del Factor C de la presente invención inmovilizado en un soporte sólido. Específicamente, el soporte sólido puede ser una resina de cromatografía. El método para eliminar la endotoxina puede emplearse en modo columna o en modo discontinuo, mediante flujo por gravedad o en sistemas de cromatografía líquida totalmente automatizados.

La eliminación de endotoxinas de preparaciones biológicas es de particular importancia cuando se considera el hecho de que los productos biológicos para uso farmacéutico deben estar suficientemente libres de endotoxina para permitir la administración a seres humanos. Por lo tanto, la presente invención proporciona el uso del Factor C de la presente invención en un método para producir preparaciones libres de endotoxinas, en particular preparaciones libres de endotoxinas para uso farmacéutico. Una preparación que comprende un producto biológico para uso farmacéutico puede ser el resultado directo de un proceso farmacéutico, es decir, la preparación es una preparación de proceso farmacéutico. Por lo tanto, en diversas realizaciones, la presente invención proporciona un método para eliminar la endotoxina de preparaciones de procesos farmacéuticos que comprende tratar la preparación del proceso farmacéutico con un factor C recombinante de la presente invención. Tales preparaciones de proceso farmacéutico pueden contener un fármaco o una sustancia de vacuna. En diversas realizaciones, el fármaco o sustancia de vacuna comprende un polipéptido, preferentemente una glicoproteína. En diversas realizaciones, el fármaco o la sustancia de vacuna es un antígeno de vacuna.

Específicamente, una preparación de proceso farmacéutico de acuerdo con la presente divulgación es una preparación de proceso farmacéutico líquido, más específicamente una preparación acuosa de proceso farmacéutico. En diversos aspectos de la presente divulgación, los términos "preparación de proceso farmacéutico" y "composición de proceso farmacéutico" pueden usarse indistintamente.

El alcance de la presente divulgación también abarca la realización del método para eliminar la endotoxina de acuerdo con la presente invención sobre cualquier tipo de muestra. En particular, en el presente documento se divulga un método para eliminar la endotoxina o lípido A de una muestra que comprende: (i) poner en contacto el Factor C recombinante inmovilizado producido por u obtenido a partir de un método de la presente invención con dicha muestra, de manera que la endotoxina o el lípido A en dicha muestra se une a dicho factor C recombinante inmovilizado, y (ii) separar dicho factor C recombinante inmovilizado, que tiene dicha endotoxina o lípido A unida al mismo, de dicha muestra.

Muestras

En aplicaciones que comprenden la medición cuantitativa de endotoxina, se puede usar una muestra estándar de endotoxina con una concentración conocida para generar datos que correlacionen el nivel de endotoxina y el grado de reacción del sustrato para la detección (por ejemplo, el grado de coloración, emisión de fluorescencia, y similares). Esto permite la cuantificación de la endotoxina presente en una muestra a analizar de acuerdo con la presente invención en base a los datos de correlación obtenidos.

La muestra que se va a someter a la detección y/o eliminación de endotoxina de acuerdo con la presente invención no está particularmente limitada y los ejemplos de la misma incluyen muestras de agua, muestras de tampón y muestras de medios de cultivo celular. En diversas realizaciones, la muestra es una muestra de prueba. En diversas realizaciones, la muestra es una muestra de prueba de una preparación biológica descrita en el presente documento en otra parte. En diversas realizaciones, la muestra incluye, aunque no de forma limitativa, una muestra de prueba de un equipo médico, un aparato médico, cosméticos, alimentos y bebidas descritos en el presente documento en otra parte.

En diversas realizaciones, la muestra que se va a someter a la detección y/o eliminación de endotoxina de acuerdo con la presente invención es una muestra de ensayo obtenida de un mamífero. Preferentemente, la muestra de prueba obtenida de un mamífero incluye, aunque no de forma limitativa, una muestras de sangre, una muestra de suero o una muestra de saliva. Preferentemente, el mamífero es un ser humano. En diversas realizaciones, la muestra de prueba es, por lo tanto, una muestra de sangre humana, una muestra de suero humano, o una muestra de saliva humana, preferentemente una muestra de sangre humana.

En diversas realizaciones, las muestras de prueba que se someterán a la detección y/o eliminación de endotoxina incluyen, aunque no de forma limitativa, muestras de prueba obtenidas de cualquiera de los siguientes: agua medicinal, un producto farmacéutico, una solución para infusión, una preparación de sangre. Preferentemente, la preparación de sangre se obtiene de un mamífero, más preferentemente de un humano. En diversas realizaciones, la muestra de prueba es una muestra ambiental.

En diversas realizaciones, la muestra que se va a someter a la detección y/o eliminación de endotoxina de acuerdo con la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, una muestra de una preparación biológica de, *por ejemplo*, proteínas, anticuerpos, vacunas, ácidos nucleicos, tampones y/o varias otras sustancias. En varias otras realizaciones, la muestra que se va a someter a la detección y/o eliminación de endotoxina de acuerdo con la presente invención incluye, aunque no de forma limitativa, una muestra de una preparación de proceso farmacéutico descrita en otra parte en el presente documento.

Ensayos y kits

Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, los términos como "método para la detección de endotoxina" o "método para detectar endotoxina" se pueden usar indistintamente con el término "ensayo para

endotoxina". Por lo tanto, la presente invención proporciona un ensayo para endotoxina que comprende la aplicación de factor C recombinante producido por un método de la presente invención de acuerdo con los métodos para detección de endotoxina descritos en el presente documento en otra parte, donde la proteína del factor C producida exhibe actividad de serina proteasa al unirse a la endotoxina. Básicamente, un ensayo para endotoxina de acuerdo con la presente invención comprende las mismas etapas del método que un método para la detección de endotoxinas según la presente invención.

Adicionalmente, en el presente documento se divulga un kit para la detección de endotoxina que comprende un factor C recombinante de la presente invención, es decir, un factor C producido por un método de acuerdo con la presente invención. El kit puede comprender además instrucciones para un método para la detección de endotoxinas o un ensayo para la endotoxina de la presente invención. Específicamente, las instrucciones pueden estar en la forma de un manual.

En varios aspectos, el kit comprende además un tensioactivo, que aumenta la sensibilidad de la detección de endotoxina. El tensioactivo y la proteína del factor C pueden estar presentes en el kit en recipientes separados.

En varios aspectos, el kit comprende un único recipiente con una composición o solución de la presente invención que comprende el factor C recombinante de la presente invención y un tensioactivo como se describe en el presente documento en otra parte.

En varios aspectos, el tensioactivo contenido en el kit es un tensioactivo anfótero. En varios otros aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo aniónico o un tensioactivo catiónico. En varios otros aspectos, el tensioactivo es un tensioactivo no iónico. Específicamente, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en ZWITTERGENT 3-14, Triton X-100, Triton X-114, octil-beta-D-tioglucoído, Genapol C-100, Tween 20 y Tween 80. Específicamente, el tensioactivo está presente en el kit a una concentración de 0,001 a 0,5 %, más específicamente a una concentración de 0,001 a 0,025 %, aún más específicamente a una concentración de 0,001 a 0,01 %. En varios aspectos, el tensioactivo está presente en el kit a una concentración de 0,004 a 0,006 %. Esto incluye la presencia del tensioactivo en un recipiente separado o en una composición o solución de la presente invención, que comprende tanto el Factor C recombinante de la presente invención como el tensioactivo.

En varios aspectos, el recipiente que comprende el tensioactivo es un recipiente que comprende un tampón, que comprende además el tensioactivo.

En varios aspectos, el kit comprende además un sustrato del factor C. Específicamente, la escisión del sustrato del factor C por la actividad hidrolítica del factor C activado (es decir, activación autocatalítica en presencia de endotoxina o lípido A como se describe en el presente documento en otro lugar) genera una señal detectable. Específicamente, el kit puede comprender un sustrato de factor C cromogénico y/o fluorogénico. En varios aspectos, el sustrato del factor C es un sustrato peptidil-pNA cromogénico. En varios otros aspectos, el sustrato del factor C es un sustrato de peptidil-AMC, peptidil-AFC o peptidil-MCA fluorogénico. Otros sustratos del factor C a modo de ejemplo incluyen, aunque no de forma limitativa, N-t-Boc-DPR-AMC, N-t-Boc-VPR-AMC, N-t-Boc-VPR-MCA, Mu-VPR-AFC y Boc-VPR-pNA.

Proceso de generación de una célula huésped de protozoo parásito que produce factor C recombinante

La presente invención proporciona un proceso para generar una célula huésped de protozoo parásito que produce proteína del factor C recombinante, que comprende las etapas de: (a) introducir una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector o un plásmido, que comprende un polinucleótido que codifica el factor C heterólogo de cangrejo herradura en una célula huésped de protozoo parásito y (b) seleccionar una o más células huésped producidas en la etapa (a) que expresan dicha proteína del factor C. Preferentemente, un vector o un plásmido de acuerdo con la presente invención se introduce en la célula huésped de protozoo parásito, es decir, un vector o plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura heteróloga. Adicionalmente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula huésped de protozoo parásito cinetoplástico. Más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito cinetoplástico es un tripanosomátido digenético (es decir, un miembro digenético del orden Trypanosomatida). Aún más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del orden Trypanosomatida. Incluso más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del género *Leishmania*. Lo más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es *Leishmania tarentolae*.

La presente invención también proporciona una célula huésped de protozoo parásito, donde la célula huésped de protozoo parásito se caracteriza por un polinucleótido que codifica el factor C heterólogo de cangrejo herradura, donde dicho polinucleótido está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector o un plásmido, introducido en la célula huésped del protozoo parásito. Preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito comprende un vector o un plásmido de acuerdo con la presente invención, es decir, un vector o plásmido que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura heteróloga. Adicionalmente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula huésped de protozoo parásito cinetoplástico. Más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito cinetoplástico es un tripanosomátido

digenético (es decir, un miembro digenético del orden Trypanosomatida). Aún más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del orden Trypanosomatida. Incluso más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es una célula del género *Leishmania*. Lo más preferentemente, la célula huésped de protozoo parásito es *Leishmania tarentolae*.

5

Líneas celulares

En el presente documento también se divulgan líneas celulares transfectadas de forma estable que pueden obtenerse mediante los vectores y/o plásmidos divulgados. Específicamente, las líneas celulares transfectadas pueden ser líneas celulares obtenidas de la transfección estable de células de protozoos parásitos de cinetoplástidos. Más específicamente, las líneas celulares transfectadas pueden ser líneas celulares obtenidas de la transfección estable de células del orden Trypanosomatida. Más específicamente, las líneas celulares transfectadas pueden ser líneas celulares obtenidas de la transfección estable de células del género *Leishmania*. Aún más específicamente, las líneas celulares transfectadas son líneas celulares obtenidas de la transfección estable de células de la especie *Leishmania tarentolae*.

15

Otras definiciones generales

En general, siempre que en el presente documento se haga referencia al factor C producido de acuerdo con un método de la presente invención, o al "Factor C obtenido de acuerdo con un método de la presente invención", o simplemente al "Factor C de la presente invención", tal referencia incluye cualquier fragmento, análogo o derivado funcional de dicho factor C de la presente invención que tenga actividad enzimática de tipo factor C, es decir, actividad enzimática de tipo factor C de un cangrejo herradura como se describe en el presente documento en otra parte.

25

En la presente invención, el "porcentaje (%) de identidad de secuencia" se determina comparando dos secuencias alineadas óptimamente sobre una ventana de comparación, donde la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni deleciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que la base del ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico se produce en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Los términos "idéntico" o porcentaje de "identidad", en el contexto de dos o más ácidos nucleicos o secuencias polipeptídicas, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para correspondencia máxima sobre una ventana de comparación, o una región designada medida usando uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. Por tanto, se dice que dichas secuencias son "sustancialmente idénticas". Esta definición también se refiere a la complementaria de una secuencia problema. Opcionalmente, la identidad existe en una región que tiene al menos aproximadamente 50 aminoácidos o nucleótidos de longitud, o más preferentemente en una región que tiene 75-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

30

Para comparar secuencias, típicamente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se usa un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. Se pueden usar los parámetros por defecto del programa o parámetros alternativos. A continuación, el algoritmo de comparación de secuencias calcula el porcentaje de identidades de secuencia para las secuencias problema con respecto a la secuencia de referencia, en base a los parámetros del programa. Los términos molécula de ácido nucleico y secuencia de ácido nucleico pueden usarse aquí de forma intercambiable.

45

Como se trata en el presente documento, existen numerosas variantes de las proteínas y polipéptidos de la presente invención. Los expertos en la técnica comprenden bien las variantes y derivados de proteínas, y pueden implicar modificaciones de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las modificaciones de la secuencia de aminoácidos típicamente entran dentro en una o más de tres clases: variantes de sustitución, inserción o deleción. Las inserciones incluyen fusiones en los extremos amino y/o carboxilo, así como inserciones intrasecuencia de uno o varios restos de aminoácidos. Las deleciones se caracterizan por la eliminación de uno o más restos de aminoácidos de la secuencia de proteínas. Típicamente, no se delecionan más de aproximadamente 2 a 6 restos en cualquier sitio dentro de las moléculas de proteína de acuerdo con la presente invención. Estas variantes se preparan habitualmente mediante mutagénesis específica de sitio de nucleótidos en el ADN del polinucleótido que codifica la proteína, produciendo de ese modo ADN que codifica la variante, y, a continuación, expresando el ADN en cultivo celular recombinante de acuerdo con la presente invención. Las técnicas para realizar mutaciones de sustitución en sitios predeterminados en el ADN que tienen una secuencia conocida son bien conocidas por los expertos en la materia. Las sustituciones de aminoácidos son típicamente de restos individuales, pero pueden producirse en varios lugares diferentes a la vez; las inserciones habitualmente serán del orden de aproximadamente 1 a 10 restos de

60

aminoácidos; y las delecciones variarán de aproximadamente 1 a 30 restos. Las delecciones o inserciones preferentemente se hacen en pares adyacentes, *es decir*, una delección de 2 restos o una inserción de 2 restos. Las sustituciones, delecciones, inserciones o cualquier combinación de las mismas se pueden combinar para llegar a una construcción final. Las mutaciones no deben colocar la secuencia fuera del marco de lectura y, preferentemente, no

- 5 crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm. Las variantes de sustitución son aquellas en las que se ha eliminado al menos un resto de aminoácido y se ha insertado un resto de aminoácido diferente en su lugar de modo que se obtiene una sustitución conservadora. El significado de una sustitución conservadora es bien conocido por los expertos en la técnica.
- 10 Ciertas modificaciones postraduccionales son el resultado de la acción de las células huésped recombinantes de la presente invención sobre el polipéptido expresado. Los restos de glutamilo y asparaginilo se desaminan a menudo postraduccionalmente y se convierten en los restos correspondientes de glutamilo y asparilo. Como alternativa, estos restos se desaminan en condiciones ácidas suaves. Otras modificaciones postraduccionales incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de los grupos hidroxilo de los restos serilo o treonilo, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina, acetilación del amino N-terminal y, en algunos casos,
- 15 amidación del carboxilo C-terminal. Dichas modificaciones postraduccionales también están contempladas por la presente invención.

- 20 Los términos "proteína" y "polipéptido" se usan indistintamente en la presente invención. Los términos "proteína(s) del factor C" y "polipéptido(s) del factor C" se pueden usar en consecuencia en el presente documento indistintamente.

- 25 Cuando en el presente documento se describen realizaciones particulares de la invención, los párrafos/pasajes de texto correspondientes de la descripción hacen referencia, invariablemente, a los medios y/o métodos descritos en otra parte en la descripción. En este contexto, se usan términos como "de acuerdo con la presente invención", "de la presente invención" y "proporcionado por la presente invención". Esto significa que cuando se describe una realización particular de la invención en un determinado párrafo o pasaje de texto, se hace referencia a los medios y/o métodos "de acuerdo con la presente invención" o "de la presente invención", que se describen en otra parte en la presente descripción. Para una realización particular descrita, se pretende que tales referencias se incorporen
- 30 para la realización particular de todos los medios y/o métodos, que se describen en otra parte de la presente descripción, y que son proporcionados por la presente invención y, por lo tanto, forman parte del alcance de la invención. Por ejemplo, si la descripción de una realización particular se refiere a "Factor C de acuerdo con la presente invención" o "Factor C de la presente invención", o "Factor C producido por u obtenido de un método de la presente invención", se pretende que todas las proteínas del Factor C, que se describen en otra parte de la descripción y que son proporcionadas por la presente invención y, por lo tanto, forman parte del alcance de la invención, son aplicables a esa realización particular. Esto se aplica particularmente, *por ejemplo*, a fragmentos y
- 35 variantes de proteínas del Factor C de acuerdo con la presente invención, que se definen en la presente invención y que son aplicables a las diversas realizaciones descritas a lo largo del texto de la solicitud.

- 40 El principio anterior se aplica a todas las realizaciones que hacen uso de términos como "de acuerdo con la presente invención", "de la presente invención" y/o "proporcionados por la presente invención". Ni que decir tiene que no cada realización descrita en el presente documento puede mencionar específicamente todos los medios y/o métodos de la invención, que ya están definidos en otra parte de la descripción, y que son aplicables a las diversas realizaciones descritas en el texto de la solicitud. Por otra parte, cada solicitud de patente comprendería varios cientos de páginas
- 45 de descripción.

- Adicionalmente, términos como "en diversas realizaciones" y "en otras diversas/otras realizaciones" significan obviamente "en diversas realizaciones de la presente invención" y "en diversas/otras realizaciones adicionales de la presente invención".

- 50 La invención se ejemplifica mediante los siguientes ejemplos, que son de naturaleza ilustrativa solamente y no deben interpretarse como limitativos del alcance de la presente invención de ninguna manera o ninguna extensión.

Ejemplos

- 55 **Ejemplo 1: Clonación del gen del factor C en el vector de expresión y transformación de *E. coli* DH5 α**

- El punto de partida para la clonación del gen del factor C en un vector de expresión fue la secuencia del factor C de *Tachypleus tridentatus* (Número de acceso NCBI P28175.1; referencia 1 en el mismo: Muta et al. 1991, J. Biol. Chem. 266(10):6554-6561). La secuencia de aminoácidos de la proteína del factor C de tipo silvestre de *T. tridentatus* como se muestra con el número de acceso P28175.1 tiene una longitud de 1.019 restos de aminoácidos. La secuencia líder, que se escinde después de la expresión y secreción de la proteína, tiene una longitud de 25 restos de aminoácidos (restos 1-25 de la secuencia de aminoácidos mostrada con el número de acceso P28175.1). La secuencia de aminoácidos de la proteína del factor C de tipo silvestre de *T. tridentatus* sin la secuencia líder se muestra en la SEQ ID NO: 2. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína del factor C de tipo silvestre de *T. tridentatus* como se muestra en la SEQ ID NO: 2 se proporciona en la SEQ ID NO: 1.

La secuencia de *T. tridentatus* de la SEQ ID NO: 1 se optimizó por codones para la expresión en *Leishmania*. La secuencia optimizada de codones generada se muestra en la SEQ ID NO: 3. La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos optimizada por codones de la SEQ ID NO: 3 se muestra en la SEQ ID NO: 4. La optimización de codones no dio como resultado un cambio de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de la proteína del factor C de tipo silvestre original. Por lo tanto, la secuencia de aminoácidos de la de SEQ ID NO:4 es idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

La secuencia optimizada por codones de la SEQ ID NO: 3 se clonó en un vector de expresión y el plásmido resultante se transformó posteriormente en *E. coli* DH5α.

Ejemplo 2: Transfección de *Leishmania* y selección de clones

Preparación de vectores de expresión para transfección

Se preparó un vector de expresión específico de la célula huésped *Leishmania*, que comprende la secuencia optimizada de codones de SEQ ID NO: 3 y una secuencia de péptido señal para la expresión secretora de la proteína diana en células huésped de *Leishmania*. La secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido señal secretora de *Leishmania tarentolae* se muestra en la SEQ ID NO: 5. La secuencia líder de *Leishmania* se escinde después de la expresión y secreción de la proteína.

Transfección de células de Leishmania

La transfección de ADN estable de una amplia gama de tripanosomátidos, incluida la transfección de *Leishmania* por electroporación, se ha descrito en la materia (Beverly y Clayton 1993, Methods Mol. Biol. 21:333-348; Coburn et al. 1991, Mol. Biochem. Parasitol. 46: 169-179). En el presente documento, el cultivo y la transfección de células de *Leishmania* se realizaron aplicando un protocolo de alto voltaje para la transfección (Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania). En particular, las células de *Leishmania* (*Leishmania tarentolae*) obtenidas de un precultivo se cultivaron hasta alcanzar una densidad celular de aproximadamente 6×10^7 células/ml (DO 1,4). Mediante microscopía se aseguró que las células fueran vitales y de forma similar a una gota. Las células previamente enfriadas se añadieron a un tubo con 0,1 - 5 µg de ADN transformante (en hielo), se mezclaron y se transfirieron a una cubeta de electroporación (en hielo). Se realizaron pulsos 2 veces 1.500 V, 25 µF con 10 segundos entre pulsos (tiempo del pulso aproximadamente 0,3 ms) usando un generador de impulsos con un controlador de impulsos. La cubeta se volvió a colocar sobre hielo durante 10 minutos, y, a continuación, se transfirieron las células sometidas a electroporación a un matraz de cultivo tisular ventilado, seguido de incubación durante la noche a 26 °C como cultivo de suspensión estática (aproximadamente 20 horas, D.O. 0,3-0,4).

Selección de clones

La selección de clones se realizó mediante siembra en placas en medios sólidos suplementados con antibióticos selectivos. A continuación, los clones individuales se expandieron en medios selectivos. Con este fin, se cultivaron hasta 10 clones en 10 ml cada uno en matraces de cultivo. Estos cultivos se utilizaron para la evaluación.

Se aisló el ADN genómico y se confirmó la inserción del gen del factor C recombinante mediante PCR usando oligonucleótidos específicos para el gen del factor C recombinante. La expresión génica se analizó diluyendo los cultivos 1:10 en medio recién preparado que contenía 10 µg/ml de tetraciclina para la inducción de la expresión. Los cultivos se cultivaron a 26 °C en la oscuridad durante 3-4 días. Las células se cosecharon (3.000 x gramo, 4 °C, 10 minutos). Las proteínas en los sobrenadantes se concentraron mediante precipitación con ácido tricloroacético (TCA) y se analizaron mediante SDS-PAGE.

Ejemplo 3: Expresión y purificación de la proteína del factor C recombinante

La expresión de proteína recombinante en protozoos tripanosomátidos, in particular in *Leishmania*, se describe en la técnica (Breitling et al. 2002, Protein Expression y Purification 25:209-218; Basile y Peticca 2009, Mol. Biotechnol. 43:273-278). En el presente documento, el cultivo y la ingeniería de *Leishmania* para la expresión y purificación de la proteína del factor C se realizó usando un kit de expresión génica proporcionado por Jena Bioscience GmbH, Jena, Alemania.

3.1 Mantenimiento de las cepas de producción

Las cepas de producción se cultivaron en un volumen de 10 ml en matraces de cultivo a 26 °C en la oscuridad. Las cepas se diluyen en serie a 1:20 o 1:50 cada 2 - 3 días en medio de cultivo fresco que contiene todos los aditivos y antibióticos para la selección de los genes insertados.

Tras 3 meses, se descartaron las cepas cultivadas y se inició un nuevo cultivo a partir de un caldo de glicerol nuevo.

3.2 Expresión

Se preparó un precultivo diluyendo la cepa de producción a 1:50 en medio nuevo y se incubó en matraces de cultivo a 26 °C en oscuridad durante 2-3 días.

Se inocularon 1,5 ml de medio de cultivo que contenía tetraciclina para la inducción de la expresión en un matraz Erlenmeyer con 30 ml del precultivo. La expresión tiene lugar a 23 °C en la oscuridad y agitando a 105 rpm durante 68 - 72 horas. Cuando la concentración de glucosa en el medio disminuyó por debajo de 650 mg/l, se añadieron hemina y glucosa y el cultivo se incubó durante 86 - 72 horas adicionales.

Se cosecharon las células (4000 x gramo, 4 °C, 30 minutos). El sobrenadante se congeló a -20 °C o se usó directamente para la purificación del factor C recombinante.

3.3 Purificación

3.3.1 Cromatografía de intercambio catiónico

El sobrenadante de la expresión se usó directamente o se descongeló suavemente. Después de añadir EDTA 2 mM, el sobrenadante se diluyó con acetato de potasio 20 mM, EDTA 2 mM, pH 5 hasta un pH de 5,0 - 5,5 y se alcanzó una conductividad de <5,5 mS/cm.

La purificación se realizó usando cromatografía de intercambio catiónico. Se usó una columna SP650M con acetato de potasio 25 mM, EDTA 2 mM a pH 5 como tampón de equilibrado y acetato potásico 25 mM, EDTA 2 mM, cloruro potásico 1M, pH 5 como tampón de elución.

Después de la carga del sobrenadante, la columna se lavó primero con tampón de equilibrado, luego con 10 % de tampón de elución. La elución tiene lugar a 50 % de tampón de elución.

3.3.2 Análisis de proteínas

Las fracciones que contenían proteína se analizaron mediante filtración en gel y SDS PAGE con respecto a la concentración y la pureza.

Para la filtración en gel, se cargaron 50 µl de cada fracción en una columna TSK3000 PW con 0,75 ml/min. La absorción se siguió a 220 nm. El rFC eluye en un pico máximo con un tiempo de retención de 7,4 +/- 0,4 minutos.

Solo las fracciones que cumplían los siguientes criterios se agruparon:

- 1) El área del pico del pico con un tiempo de retención de 6,4 +/- 0,4 minutos no debe exceder el 10 % del área del pico de rFC.
- 2) El área de pico del pico con un tiempo de retención de 10,3 +/- 0,5 minutos no debe exceder el 350% del área del pico de rFC.
- 3) El mínimo entre el pico de rFC y el pico con un tiempo de retención de 10,3 +/- 0,5 minutos tiene que estar entre 9 y 10 minutos, y el valor de absorción del mínimo no debe exceder el 30 % del valor máximo de absorción del pico de rFC.

La concentración de rFC en cada fracción se determinó mediante el área del pico con la ayuda de una curva patrón de rFC. La concentración del conjunto final debe ser de al menos 50 µg/ml de rFC.

3.3.3 Diálisis

Se añadió PMSF 1mM al conjunto de rFC y se incubó durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió Pluronic® F-127 al 0,1 % y la solución se dializó contra 5 litros de acetato potásico 5 mM, cloruro potásico 100 mM, Pluronic® F-127 al 0,1 %, EDTA 0,05 mM a pH 5 a 4°C. La diálisis se realizó 3 veces durante 12 horas cada vez.

Tras la tercera diálisis, la solución rFC se centrifugó (4.000 x g, 4 °C, 1 hora) y de nuevo se dializó el sobrenadante contra 5 litros de acetato potásico 5 mM, cloruro potásico 100 mM, 0,1 % Pluronic® F-127, EDTA 0,05 mM, pH 5 at 4 °C durante al menos 12 horas.

3.3.4 Almacenamiento

La solución de rFC dializada se filtró en condiciones estériles, y la concentración se determinó mediante filtración en gel y pureza mediante SDS Gel. La solución se almacenó a 4 ° C.

Ejemplo 4: Determinación de la actividad específica de la proteína del factor C producida en *Leishmania*

La actividad específica del Factor C se determinó de acuerdo con el ensayo descrito en Ding et al. 1993 (Biochimica

et Biophysica Acta 1202:149-156). Este documento se ha citado en la patente de Estados Unidos US 5.712.144 por el ensayo, que se usó para determinar la actividad específica de la proteína del factor C aislada del cangrejo herradura *C. rotundicauda*.

- 5 En particular, primero se realizó una serie de diluciones diluyendo la proteína del factor C producida en *Leishmania* en tampón de reacción más LPS. El tampón de reacción comprende Tris 50 mM, NaCl 100 mM y MgCl₂ 50 mM. y se preparó usando agua ultrapura exenta de endotoxina. Se añadió LPS al tampón de reacción a partir de una solución madre de LPS (LPS en disolución en agua ultrapura libre de endotoxinas).
- 10 Se cargó una placa de microtitulación y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, se añadió un sustrato para la proteína C del factor C, seguido de incubación de la placa de microtitulación durante 15 minutos a 37 °C. El sustrato usado fue boc-Val-Pro-Arg-AMC, que es un sustrato fluorogénico para la proteína del factor C. Boc-VPR-AMC se disolvió en agua ultrapura libre de endotoxinas para preparar una solución de sustrato, que se usó para preparar diluciones de la solución de sustrato, que se aplicaron al ensayo. Después de detener la reacción mediante la adición de ácido acético glacial, se midió la fluorescencia (UFR). Los valores de UFR medidos después de 15 minutos de recambio de sustrato a 37 °C se resumen en la siguiente Tabla 1.

Tabla 1: Valores de UFR medidos después de 15 minutos de recambio de sustrato a 37 °C

concentración de rFC (µg/ml)	factor de dilución de rFC	rFC + LPS (UFR)
5,3	1	19999
2,65	0,5	17571
1,325	0,25	12446
0,6625	0,125	8174
0,33125	0,0625	4360
0,165625	0,03125	1903
0,0828125	0,015625	669
0,04140625	0,0078125	148

20 La Tabla 1 muestra los valores de UFR de las muestras de rFC activadas por LPS con señales mayores que el fondo después de la resta de los valores de UFR de fondo.

La Figura 1 muestra el gráfico de los valores de UFR medidos después de 15 minutos de recambio de sustrato a 37 °C en dependencia de la concentración de rFC. La fluorescencia específica del fluoróforo (AMC) se determinó como 6,667 UFR/nmol en las condiciones experimentales descritas.

Para el cálculo de la actividad específica de rFC, se utilizó la concentración de rFC de 0,331 µg/ml. Esto corresponde a 0,0662 µg de rFC por pocillo en la placa de microtitulación. De acuerdo con esto, se midieron 4.360 UFR/(15 min x 0,0662 µg de rFC). Esto corresponde a 290,67 UFR/(min x 0,0662 µg de rFC). Esto a su vez corresponde a 4.390.735 UFR/(min x mg de rFC). Esto además corresponde a 658 nmol/(min x mg de rFC), que a su vez corresponde a 0,658 µmol/(min x mg de rFC).

De acuerdo con Ding et al. (1993), una unidad se define como 1 µmol de AMC hidrolizado por min a 37 °C. De acuerdo con esta definición y el cálculo anterior, el factor C recombinante tiene una actividad específica de 0,658 unidades/mg de proteína en las condiciones de ensayo descritas. La misma actividad específica también se encontró cuando se usó quimotripsina para la activación de la proteína del factor C (datos no mostrados).

Como queda claro a partir de la configuración del ensayo, la actividad específica se determinó usando la proteína del factor C activada por LPS. Por lo tanto, este experimento muestra que el Factor C producido en *Leishmania* puede ser activado por LPS y que la proteína del factor C activada es enzimáticamente activa, es decir, exhibe actividad hidrolítica.

Ejemplo 5: Determinación del peso molecular de la proteína del factor C en condiciones no reductoras y reductoras en SDS-PAGE

45 El peso molecular de la proteína del factor C producida en *Leishmania* se ha determinado en condiciones no reductoras y reductoras (SDS-PAGE). Se cargaron 50 µl de muestra de rFC reducida y no reducida así como 20 µl de patrón del peso molecular en un VarioGel de 10 pistas (4 - 12 %). Después de llevar a cabo la electroforesis en una cámara de electroforesis en gel vertical, el gel se tiñó con solución de tinción proteica PageBlue™ lista para usar (Fermentas) de acuerdo con el protocolo del fabricante.

Los valores de R_f se calcularon mediante división de la distancia de migración (en cm) de las bandas de proteína y la distancia de migración total desde el frente del gel (en cm). Los valores de R_f de las proteínas marcadoras se representaron frente al peso molecular de las proteínas marcadoras. La curva resultante se ajustó mediante un algoritmo de ajuste logarítmico. El peso molecular de la proteína del factor C purificado en condiciones no reductoras y reductoras, respectivamente, se calculó basándose en la ecuación de ajuste de la curva patrón generada. De

acuerdo con la ecuación, se calcularon los siguientes pesos moleculares para el Factor C:

Tabla 2: Valores de Rf del factor C purificado en condiciones de funcionamiento de SDS PAGE no reductoras y reductoras

	distancia de migración [cm]	Valores de Rf	Peso molecular calculado [kDa]
rFC ox	7,1	0,33	102
	distancia de migración [cm]	Valores de Rf	Peso molecular calculado [kDa]
rFC rojo 1	8,9	0,41	69
rFC rojo 2	12,6	0,58	37

La forma bicatenaria de la proteína del factor C tiene un peso molecular de 102 kDa según se determina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras (rFC ox). En condiciones reductoras, se ha determinado un peso molecular de 69 kDa para la cadena H (rFC rojo 1) y un peso molecular de 37 kDa para la cadena L (rFC rojo 2).

El peso molecular de la cadena H y la cadena L en condiciones reductoras (rFC rojo 1 + rFC rojo 2) se combina con 106 kDa (incluida la glucosilación).

LISTADO DE SECUENCIAS

SEQ ID NO: 1: La secuencia de nucleótidos del gen que codifica la proteína de factor C de tipo salvaje de *Tachypleus tridentatus* sin secuencia líder, longitud: 2.982 nucleótidos.

```

agagg agtagatctg ggcttgtgtg atgaaacgag gttcgagtgt
aagtgtggag atccaggcta tgtgttcaac gtccctatga aacaatgcac gtacttctat
cgatggaggc cttattgtaa accatgtgat gacctggagg ctaaggacat ttgtccaaag
tacaaacgat gtcaagagtg taaggctggt cttgatagtt gtgttacttg tccacctaac
aaatatggta cttggtgtag cggatgaatgt caatgtaaga atggagggtat ctgtgaccag
aggacaggag cttgtacctg tctgtacaga tatgaaggag cgcactgtga aattctcaaa
ggttgtcttc ttcttccatc ggattctcaa gttcaggaag tcagaaaccc accagataat
cccaaaacta ttgactacag ctgttcacca gggttcaagc ttaaaggcgt ggcacgaatt
agctgtctcc caaatggaca gtggagtagc ttccaccca aatgtattcg agaattgtcc
aagggttcat ctccagaaca cgggaaagtg aatgtctcta gtggcaatat gatagaaggg
gctactttac gggttctcat tgatagtccc tactacttga ttggtcaaga aacattaacc
tgccagggtg atgggtcagt gagtggacaa ataccacaat gtaagaagtt ggtcttctgt
cctgaccttg atcctgtaaa ccatgctgaa caccagggtta aaattgggtgt ggaacaaaaa
tatggtcagt ttctcaagg cactgaagtg acctatacgt gttcgggtaa ctacttcttg
atgggtttta acaccttaaa atgtaacct gatgggtcct ggtcaggatc acagccatcc
tgtgttaaag tggcagacag agaggctgac tgtgacagta aagctgtaga ctcttggat
gagtgtgggtg aacctgtcag gatccactgt cctgctgggt gttctttgac agctgggtact
gtgtggggta cagccatata ccacgaactt tctcagtgt gtcgtgcagc catccatgct
ggcaagcttc caaactctgg aggggcgggtg catgtagtga acaatggccc ctactcggac
tttctgggtg gtgacctgaa tgggataaaa tcggaagagt tgaagtctct tgcccgcagt
tttcgatattg attatgtcag ttcattccaca gcaggtagat caggatgtcc tgatggatgg
tttgaggtag aagagaactg tgtgtacgtt acatcaaaac agagagcctg ggaaagagct
caagggtgtgt gtaccaatat ggctgctcgt cttgctgtgc tagacaaaga tctaattccg
agttccttga ctgagactct acgagggaaa gggtaacaa ccacatggat aggtatgcac
agactagatg ctgagaagcc ctttgtttgg gagctaattg atcgtagtaa tgtgttctg
aatgataacc taacattctg ggctctgggc gaacctggaa atgaaactaa ctgtgtatat
ctggacatcc gagatcagct gcagcctgtg tggaaaacca agtcatgttt tcagccctca
agctttgctt gcatgatgga tttgtcagac agaaataaag ccaaatgcga tgacctgga
ccactggaaa atggacacgc cacacttcat ggacaaagta ttgatgggtt ctatgctggt
tcttctataa ggtacagctg tgagggttct cactacctca gtggaactga gaccgttaact
tgtacaacaa atggcacatg gagtgcctct atatgggttct gtggaatca aacccccaa
tcgatcagtc gtgttgggtc accttctctg aggttgccac ggttacctc ccattagcc
agagcagcca aacctcctcc aaaacctaga tctcacaac cctctactgt cctattggct
tctaaagtta aactacctga aggtcattac cgggtagggt ctcgagccat ttacacgtgc
gagtcgagat actacgaact acttggatct caaggcagaa gatgtgactc taatggaaac
tggagtgggtc ggcccgtag ctgtattcca gtttgtggac ggtcagactc tctcgttct
cctttcatct ggaatgggaa ttctacagaa ataggtcagt ggccgtggca ggcaggaaac
tctcgatggc ttgcagacca caatatgtgg tttctccagt gtggaggatc cctattgaat
gagaaatgga tctgactgc tgccccactgt gtcacctact ctgctactgc tgagataatt
gatcccagtc agtttaaaat ctatctgggc aagtactacc gtgatgacag tagagacgat
gactacgtac aagtaagaga ggctctcgag atccacgtaa atcctaacta cgaccccggc
aatctcaact ttgacatagc cctaattcaa ctgaaaactc ctgttacttt gacaacacga
gtccaaccaa tctgtctgcc tactgacatc acaacaagag aacacttgaa ggagggaaca
ttagcagtggt tgacaggttg gggtttgaat gaaaacaaca catattcaga gatgattcaa
caagctgtgc tacctgttgt tgcagcaagc acctgtgaag aggggtacaa ggaagcagac
ttaccactga cagtaacaga gaacatgttc tgtgcaggtt acaagaaggg acgttatgat
gcctgcagtg gggacagtgg aggaccatta gtgtttgctg atgattcccg taccgaaagg
cgggtgggtct tggagggtat tgctcagctg ggcagtccca gtggatgtgg caaggctaac
cagtatgggg gcttactaa agttaacgtt tttctatcat ggattaggca gttcatt

```

SEQ ID NO 2: La secuencia de aminoácidos de la proteína de Factor C natural de *Tachypleus tridentatus* sin secuencia líder, longitud: 994 restos de aminoácidos.

rgvdlglcdetrfeckcgdpgyvfnvpmkqctyfyrwrpyckpcddleakdicpkykrcqeckagldscvtcp
pnkygtwscgecqcknggicdqrtgactcrdryegahceilkgcpllpdsqvevrnppdnpgtidyscspg
fklkgvariscplnggwssfpkciirecakvsspehgkvnapsngmiegatlrfsdcsppyyliggetltcqn
gqwsqgipqckklvfcpldpvnhaehqvkigveqkygqfpggttevtctcsnyflmgfntlkcnpdgswsgs
qpscvkvadrevdcskavdflddvgepvrihpcagcsltagtvtwgtaiyhelsvcrasahagklpnsggav
hvvnnpgpysdflgsdlngikseelkslarsfrdyvssstagrsgcpdgwfeveencvyvtskqraweraqgv
ctnmaarlavlkdliipssltetlrgkgltttwiglhrldaekpfvwlmdrsnvvlndnltfwagsepgnet
ncvyldirdqlqpvwtkscfqpssfacmmdlslrnkakcdpplenghatlhggsidgfyagssiryscev
lhylsgtetvtcttngtwsapkprcikvitcqnppvpsysgsveikppsrtnsisrvsgspflrlplrlplara
akpppkprssqpsvdlaskvklpeghyrvgsraiycesryyellsgqrrcdsngnwsgrpascipvcgrs
dsprspfiwngnsteigqwpwagisrwladhnmwflqcggslnekwiwtaahcvtsataeiiidpsqfkiy
lgkyrddsrdddyvqrealeihvnpnydpnlnfdialiqktpvtlttrvqpicipltdittrehlkegt
lavvtgwlgnenntysemiqqavlpvvaastceegykeadlptvtenmfcagykkgrydacsgdsggplvfa
ddsrterrwvlegivswgspgsgcganqyggftkvnvflswirqi

SEQ ID NO 3: La secuencia de nucleótidos del Factor C de *T. tridentatus* sin secuencia líder, optimizado por codones para la expresión en *Leishmania*, longitud: 2.982 nucleótidos.

5

aggggtgtggacctgggcctgtgagcagagaccgcttcgagtgcaagtgcggcgacccgggctacgtgttca
acgtgccgatgaagcagtgacgtacttctaccgctggcgcccgactgcaagccgtgcgacgacctggaggc
gaaggacatctgccgaagtacaagcgctgccaggagtgaaggcgggcctggacagctgcgtgacgtgccc
ccgaacaagtacggcacgtggtgcagcggcgagtgccagtgcaagaacgggtggcatctgcgatcagcgacgg
gcgctgcacatgccgcgatcgctacgagggcgcgactgcgagatcctgaagggtgcccgctgctgccgag
cgacagccaggtgcaggaggtgcgcaaccgcccggacaaccgcccagacgatcgactactcgtgcagccccggc
ttcaagctcaaggcgctggcgcgcatcagctgcctccgaacgggtcagtggtcgagcttcccgcgaagtga
tccgcgagtgcggaaggtgagcagccggagcagcggaaggtgaacgcgcccagcgggcaacatgatcgagg
cgcgacgtgcgcttcagctgcgacagcccgactactcctgatcgccagagagacctgacctgccagggcaac
ggcagtgagcggccagatcccgcagtgcaagaagctggtcttctgcccggaacctggaccgggtgaaccacg
cggagcaccaggtgaagatcgccgctggagcagaagtacggccagttcccgcagggcacggaggtgacgtacac
gtgcagcggcaactacttctgatgggcttcaacacgctgaagtgaaccggacggtagctggtcgggcagc
cagccgtcctgctgaaggtggcggaaccgagaggtggactgcgacagcaaggcggtggacttctggacgacg
tggcgagccgggtgcgcatccactgccgggctggctgcagcctgacagcgggacaggtgtggggcagcggtg
ctaccacgagctgtcgagcgtgtgcgcgctgcgatccacgcgggcaagctgccgaacagcggcggtgcggtg
cacgtggtgaacaacggcccgtacagcgacttctgggcagcgacctgaacggcatcaagagcgaggagctga
agagcctggcccgcagcttccgcttcgactacgtgagcagcagcagcgctggtcgagcgggtgcccggaagg
ctggttcgaggtggaggagaactgcgtctacgtcacgagcagcgcgctgggagcgcgcgcagggcgctg
tgcacgaacatggcggtcgccctggcgtgctggacaaggacctgatcccagcagcctgacggagacctgc
gggcaaggccctgacgacgacgtggatcgccctgcaccgctggacgcggagaagccgttcgtgtgggagct
gatggaccgcagcaacgtggtgctgaacgacaacctgacgttctgggcgagcggcgagccgggcaacgagacc
aactgcgtgtacctggacatccgcgaccagctgcagccgggtgtggaagacgaagagctgcttccagccgagct
ccttcgctgcatgatggacctgagcagccgcaacaaggcgaagtgcgacgacccgggtccgctggagaacgg
ccacgcgacgtgcacggccagagcatcgacggcttctacgcgggcagcagcatccgctacagctgcgaggtg
ctgactacctgagcggcacggagacctgacgtgcagcagcaacggcacgtggtccgcgcgaagccgcgct
gcatcaaggtgatcacgtgccagaaccgcccgggtgccgagctacggcagcgtggagatcaagccgcgctgcg
cacgaactcgattagccgcgtgggctcgccgttctgctctgccacgcctcccactgccgctggctcgtgcg
gccaagccgccaccgaagccacgcagcagccagccagcagcgggtggacctggccagcaaggtgaagctgccgg
agggccactaccgctgggctcgcgcgcgatctacacgtgcgagagccgctactacgagctgctgggcagcca
gggtcgtcgtgcgacagcaacggcaactggagcgggtcgcccggctagctgcatcccggtgtgcggtcgagc
gactccccgcgctcgccgttcatctggaacggcaacagcagcgagatcggtcagtgccctggcagggcgga
tcagccgctgggtggccgaccacaacatgtggttctccagtgccggcgagcctgctgaacgagaagtggat
tgtgacggcggtcactgcgtgacgtactcggcgacggccgagatcatcgaccgagccagttcaagatctac
ctgggcaagtaactaccgcgacgacagccgcgacgactacgtgcaggtgcgagggcgctggagatccacg

tgaacccgaactacgacccgggcaacctgaacttcgatatcgcgctgatccagctcaagacgcccgggtgacgct
gacgacgcgcgtgcagccgatctgcttgcgcgacggacatcacgacgcgcgagcacctgaaggagggcacgctg
gccgtcgtgacgggctggggcctgaacgagaacaacacgtacagcgagatgatccagcagggcggtgctgccgg
tggtggcgcgagcacgtgcgaggagggctacaaggagggcgacctgccgctgacgggtgacggagaacatggt
ctgcgcgggctacaagaaggccgctacgacgcctgcagcgggtgacagcggcggtccgctggtgttcgcggac
gacagccgcacggagcgccgctgggtgctggagggcatcgtgagctggggcagcccgagcgggttcgggcaagg
cgaaccagtagcggcggttcacgaagggtgaacgtgttcctcagctggatccgccagttttatc

SEQ ID NO 4: La secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos optimizada por codones de la proteína del factor C de *Tachypleus tridentatus* sin secuencia líder como se muestra en LA SEQ ID NO: 3, longitud: 994 restos de aminoácidos.

RGVDLGLCDETRFECKCGDPGYVFNVPKQCTYFYRW
RPYCKPCDDLEAKDICPKYKRCQECKAGLDSCVTCPPNKYGTWCSGECQCKNGGICDQRT
GACTCRDRYEGAHCEILKGCPLLPDSQVQEVNPPDNPQTIDYSCSPGFKLKGVARISC
LPNGQWSSFPPKCIRECAKVSSPEHGKVNAPSGNMIEGATLRFSCDSPYYLIGQETLTCQ
GNGQWSGQIPQCKKLVFCDLDPVNHAEHQVKIGVEQKYQFPQGTEVTYTCSGNYFLMG
FNTLKCNDPDSWGSQPSVCVKVADREVDCDSKAVDFLDDVGEPVRIHCPAGCSLTAGTVW
GTAIYHELSSVCRAAIHAGKLPNSGGAVHVNNGPYSDFLGSDLNGIKSEELKSLARSFR
FDYVSSSTAGRSGCPDGFVEEENCYVVTSTKQRAWERAQGVCTNMAARLAVLDKDLIPSS
LTETLRGKGLTTTWIGLHRLDAEKPFVWELMDRSNVVLNDNLTFWASGEPGNETNCVYLD
IRDQLQPVWKTSCFQPSFACMMDLSDRNKAKCDDPGPLENGHATLHGQSIDGFYAGSS
IRYSCEVLHYLSGTETVTCTTNGTWSAPKPRCIKVITCQNPVPVPSYGSVEIKPPSRTNSI
SRVGSFPLRLPLPLPLARAAPPPKPRSSQPSSTVDLASKVKLPEGHYRVGSRAIYTCS
RYEYELLGSQGRCDNSGNWSGRPASCIPVCGRSDSPRSPFIWNGNSTEIGQWPWQAGISR
WLADHNMWFLQCGGSLLNEKWIIVTAHCVTYSATAEIIDPSQFKIYLGKYYRDDSRRDDY
VQVREALEIHVNPNYDPGNLNFIDIALIQLKTPVTLTTRVQPICLPTDITTREHLKEGTLA
VVTGWGLNENNTYSEMIQAVLPVVAASTCEEYKEADLPLTVTENMFACAGYKKGRYDAC
SGDSGGPLVFAADSRTERRWVLEGIVSWGSPSGCGKANQYGGFTKVNVLFSWIRQFI

SEQ ID NO: 5: La secuencia de aminoácidos de la secuencia del péptido señal secretora de *Leishmania tarentolae*, longitud: 23 restos de aminoácidos.

MASRLVRVLAAAMLVAAAVSVDA

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> MicroCoat Biotechnologie GmbH

<120> Nuevo método para la producción recombinante de proteína del factor C del cangrejo herradura

<130> PCT82127FZ210pau

<140> aún no asignado

<141> adjunto

<150> US 61/734.002

<151> 06/12/2012

<150> EP12195742.7

<151> 05/12/2012

<160> 5

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 2982

<212> ADN

<213> *Tachypleus tridentatus*

<400> 1

agaggagtag atctgggctt gtgtgatgaa acgagggttcg agtgtaagtg tggagatcca	60
ggctatgtgt tcaacgtccc tatgaaacaa tgcacgtact tctatcgatg gaggccttat	120
tgtaaaccat gtgatgacct ggaggctaag gacatttgtc caaagtacaa acgatgtcaa	180
gagtgtgaagg ctggtcttga tagttgtgtt acttgtccac ctaacaaata tgggtacttg	240
tgtagcgggtg aatgtcaatg taagaatgga ggtatctgtg accagaggac aggagcttgt	300
acctgtcgtg acagatatga aggagcgcac tgtgaaattc tcaaagggtg tcctcttctt	360
ccatcggatt ctcaagttca ggaagtcaga aaccaccag ataatcccca aactattgac	420
tacagctgtt caccagggtt caagcttaa ggogtggcac gaattagctg tctcccaa	480
ggacagtgga gtagctttcc acccaaagt attcgagaat gtgccaaggt ttcactcca	540
gaacacggga aagtgaatgc tcctagtggc aatatgatag aaggggctac ttacggttc	600
tcatgtgata gtccctacta cttgattggt caagaaacat taacctgcca gggtaatggt	660
cagtggagtg gacaaatacc acaatgtaag aagttggtct tctgtcctga ccttgatcct	720
gtaaaccatg ctgaacacca ggttaaaatt ggtgtggaac aaaaatatgg tcagtttct	780
caaggcactg aagtgaccta tacgtgttcg ggtaactact tcttgatggg ttttaacacc	840
ttaaaatgta accctgatgg gtccctggtca ggatcacagc catcctgtgt taaagtggca	900
gacagagagg tcgactgtga cagtaaagct gtagacttct tggatgatgt tggatgaacct	960
gtcaggatcc actgtcctgc tggctgttct ttgacagctg gtactgtgtg gggtagagcc	1020
atataccacg aactttcctc agtgtgtcgt gcagccatcc atgctggcaa gcttccaaac	1080

tctggagggg	cgggtgcatgt	agtgaacaat	ggcccctact	cggactttct	gggtagtgac	1140
ctgaatggga	taaaatcgga	agagttgaag	tctcttgccc	gcagttttcg	atttgattat	1200
gtcagttcat	ccacagcagg	tagatcagga	tgtcctgatg	gatggtttga	ggtagaagag	1260
aactgtgtgt	acgttacatc	aaaacagaga	gcctgggaaa	gagctcaagg	tgtgtgtacc	1320
aatatggctg	ctcgtcttgc	tgtgctagac	aaagatctaa	ttccgagttc	cttgactgag	1380
actctacgag	ggaaaggggt	aacaaccaca	tggataggat	tgcacagact	agatgctgag	1440
aagccctttg	tttgggagct	aatggatcgt	agtaatgtgg	ttctgaatga	taacctaac	1500
ttctgggcct	ctggcgaacc	tggaaatgaa	actaactgtg	tatatctgga	catccgagat	1560
cagctgcagc	ctgtgtggaa	aaccaagtca	tgttttcagc	cctcaagctt	tgcttgcatg	1620
atggatttgt	cagacagaaa	taaagccaaa	tgcgatgacc	ctggaccact	ggaaaatgga	1680
cacgccacac	ttcatggaca	aagtattgat	gggttctatg	ctggttcttc	tataaggtac	1740
agctgtgagg	ttctccacta	cctcagtggg	actgagaccg	taacttgtac	aacaaatggc	1800
acatggagtg	ctcctaaacc	tcgatgtatc	aaagtcac	cctgccaaaa	ccctcctgta	1860
ccatcatatg	gttctgtgga	aatcaaacc	ccaagtcgga	caaactcgat	cagtcgtgtt	1920
gggtcacctt	tcttgagggt	gccacgggt	cccctcccat	tagccagagc	agccaaacct	1980
cctccaaaac	ctagatcttc	acaaccctct	actgtggact	tggcttctaa	agttaaacta	2040
cctgaagggt	attacgggg	agggctctga	gccatttaca	cgtgcgagtc	gagatactac	2100
gaactacttg	gatctcaagg	cagaagatgt	gactctaattg	gaaactggag	tggtcggccc	2160
gctagctgta	ttccagtttg	tggacgggtca	gactctcttc	gttctccttt	catctggaat	2220
gggaattcta	cagaaatagg	tcagtggccg	tggcaggcag	gaatctctcg	atggcttgca	2280
gaccacaata	tgtggtttct	ccagtgtgga	ggatccctat	tgaatgagaa	atggatcgtc	2340
actgctgccc	actgtgtcac	ctactctgct	actgctgaga	taattgatcc	cagtcagttt	2400
aaaatctatc	tgggcaagta	ctaccgtgat	gacagtagag	acgatgacta	cgtacaagta	2460
agagaggctc	tcgagatcca	cgtaaactct	aactacgacc	ccggcaatct	caactttgac	2520
atagccctaa	ttcaactgaa	aactcctgtt	actttgacaa	cacgagtcca	accaatctgt	2580
ctgcctactg	acatcacaac	aagagaacac	ttgaaggagg	gaacattagc	agtggtgaca	2640
ggttgggggt	tgaatgaaaa	caacacatat	tcagagatga	ttcaacaagc	tgtgctacct	2700
gttgttgacg	caagcacctg	tgaagagggg	tacaaggaag	cagacttacc	actgacagta	2760
acagagaaca	tgttctgtgc	aggttacaag	aagggacggt	atgatgcctg	cagtggggac	2820
agtggaggac	cattagtgtt	tgtgatgat	tcccgtaccg	aaaggcgggtg	ggtcttgga	2880
gggattgtca	gctggggcag	tcccagtggg	tgtggcaagg	ctaaccagta	tgggggcttc	2940

actaaagtta acgtttttct atcatggatt aggcagttca tt

2982

5
<210> 2
<211> 994
<212> PRT
<213> Tachypleus tridentatus

<400> 2

Arg Gly Val Asp Leu Gly Leu Cys Asp Glu Thr Arg Phe Glu Cys Lys
 1 5 10 15
 Cys Gly Asp Pro Gly Tyr Val Phe Asn Val Pro Met Lys Gln Cys Thr
 20 25 30
 Tyr Phe Tyr Arg Trp Arg Pro Tyr Cys Lys Pro Cys Asp Asp Leu Glu
 35 40 45
 Ala Lys Asp Ile Cys Pro Lys Tyr Lys Arg Cys Gln Glu Cys Lys Ala
 50 55 60
 Gly Leu Asp Ser Cys Val Thr Cys Pro Pro Asn Lys Tyr Gly Thr Trp
 65 70 75 80
 Cys Ser Gly Glu Cys Gln Cys Lys Asn Gly Gly Ile Cys Asp Gln Arg
 85 90 95
 Thr Gly Ala Cys Thr Cys Arg Asp Arg Tyr Glu Gly Ala His Cys Glu
 100 105 110
 Ile Leu Lys Gly Cys Pro Leu Leu Pro Ser Asp Ser Gln Val Gln Glu
 115 120 125
 Val Arg Asn Pro Pro Asp Asn Pro Gln Thr Ile Asp Tyr Ser Cys Ser
 130 135 140
 Pro Gly Phe Lys Leu Lys Gly Val Ala Arg Ile Ser Cys Leu Pro Asn
 145 150 155 160
 Gly Gln Trp Ser Ser Phe Pro Pro Lys Cys Ile Arg Glu Cys Ala Lys
 165 170 175
 Val Ser Ser Pro Glu His Gly Lys Val Asn Ala Pro Ser Gly Asn Met
 180 185 190
 Ile Glu Gly Ala Thr Leu Arg Phe Ser Cys Asp Ser Pro Tyr Tyr Leu
 195 200 205
 Ile Gly Gln Glu Thr Leu Thr Cys Gln Gly Asn Gly Gln Trp Ser Gly

ES 2 674 079 T3

210	215	220
Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro 225 230 235 240		
Val Asn His Ala Glu His Gln Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr 245 250 255		
Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn 260 265 270		
Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser 275 280 285		
Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val 290 295 300		
Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro 305 310 315 320		
Val Arg Ile His Cys Pro Ala Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val 325 330 335		
Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala 340 345 350		
Ile His Ala Gly Lys Leu Pro Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val 355 360 365		
Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile 370 375 380		
Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr 385 390 395 400		
Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe 405 410 415		
Glu Val Glu Glu Asn Cys Val Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp 420 425 430		
Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val 435 440 445		
Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly 450 455 460		

Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu
 465 470 475 480
 Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn
 485 490 495
 Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn
 500 505 510
 Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr
 515 520 525
 Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser
 530 535 540
 Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 His Ala Thr Leu His Gly Gln Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser
 565 570 575
 Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu
 580 585 590
 Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg
 595 600 605
 Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly
 610 615 620
 Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val
 625 630 635 640
 Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg
 645 650 655
 Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val
 660 665 670
 Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly
 675 680 685
 Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly
 690 695 700
 Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro
 705 710 715 720

Ala	Ser	Cys	Ile	Pro	Val	Cys	Gly	Arg	Ser	Asp	Ser	Pro	Arg	Ser	Pro		
				725					730						735		
Phe	Ile	Trp	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp	Pro	Trp	Gln		
			740					745					750				
Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp	Leu	Ala	Asp	His	Asn	Met	Trp	Phe	Leu	Gln		
		755					760					765					
Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His		
	770					775					780						
Cys	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Phe		
785					790					795					800		
Lys	Ile	Tyr	Leu	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp		
			805						810					815			
Tyr	Val	Gln	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ile	His	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr		
			820					825					830				
Asp	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Leu	Lys	Thr		
		835					840					845					
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Thr	Asp		
		850				855					860						
Ile	Thr	Thr	Arg	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Thr		
865					870					875					880		
Gly	Trp	Gly	Leu	Asn	Glu	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Gln		
			885						890					895			
Ala	Val	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Tyr	Lys		
			900					905					910				
Glu	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly		
		915					920					925					
Tyr	Lys	Lys	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro		
	930					935					940						
Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp	Ser	Arg	Thr	Glu	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu		
945					950					955					960		
Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	Cys	Gly	Lys	Ala	Asn	Gln		
				965					970					975			

Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln
980 985 990

Phe Ile

<210> 3
<211> 2982
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de nucleótidos del gen sintético del factor C (secuencia de nucleótidos del factor C de *Tachypleus tridentatus* optimizada por codones para la expresión en *Leishmania*)

<400> 3

```

aggggtgtgg acctgggcct gtgcgacgag acccgcttcg agtgcaagtg cggcgacccg      60
ggctacgtgt tcaacgtgcc gatgaagcag tgcacgtact tctaccgctg gcgcccgtac      120
tgcaagccgt gcgacgacct ggaggcgaag gacatctgcc cgaagtacaa gcgctgccag      180
gagtgcagg cgggcctgga cagctgcgtg acgtgcccgc cgaacaagta cggcacgtgg      240
tgcagcggcg agtgccagt caagaacggt ggcacgtgcg atcagcgcac gggcgcgctgc      300
acatgcgcgc atcgctacga gggcgcgcac tgcgagatcc tgaagggctg cccgctgctg      360
ccgagcgaca gccagggtgca ggagggtgcgc aaccggccgg acaaccgcga gacgatcgac      420
tactcgtgca gcccgggctt caagctcaag ggcgtggcgc gcatcagctg cctcccgaac      480
ggtcagtggt cgagcttccc gccgaagtgc atccgcgagt gcgcgaagggt gagcagcccg      540
gagcacggca aggtgaacgc gccgagcggc aacatgatcg agggcgcgac gctgcgcttc      600
agctgcgaca gcccgtacta cctgatcggc caggagaccc tgacctgcca gggcaacggc      660
cagtggagcg gccagatccc gcagtgcagg aagctggtct tctgcccgga cctggaccgg      720
gtgaaccacg cggagcacca ggtgaagatc ggcgtggagc agaagtacgg ccagttcccg      780
cagggcacgg aggtgacgta cacgtgcagc ggcaactact tcctgatggg cttcaacacg      840
ctgaagtgca acccggacgg tagctggtcg ggcagccagc cgtcctgcgt gaaggtggcg      900
gaccgcgagg tggactgcga cagcaaggcg gtggacttcc tggacgacgt gggcgagccg      960
gtgcgcaccc actgcccggc tggctgcagc ctgacagcgg gcacgggtgt gggcacggcg     1020
atctaccacg agctgtcgag cgtgtgccgc gctgcgatcc acgcgggcaa gctgcggaac     1080
agcggcggtg cggtgcaagt ggtgaacaac ggcccgtaca gcgacttcct gggcagcgac     1140
ctgaacggca tcaagagcga ggagctgaag agcctggccc gcagcttccg cttcgactac     1200
gtgagcagca gcacggctgg tcgcagcggc tgcccggacg gctggttcga ggtggaggag     1260

```

aactgcgtct	acgtcacgag	caagcagcgc	gcgtgggagc	gcgcgcaggg	cgtgtgcacg	1320
aacatggcgg	ctcgccctggc	cgtgctggac	aaggacctga	tcccagagcag	cctgacggag	1380
accctgcgcg	gcaagggcct	gacgacgacg	tggatcggcc	tgcaccgcct	ggacgcggag	1440
aagccgttcg	tgtgggagct	gatggaccgc	agcaacgtgg	tgtcgaacga	caacctgacg	1500
ttctgggcga	gcggcgagcc	gggcaacgag	accaactgcg	tgtacctgga	catccgcgac	1560
cagctgcagc	cggtgtggaa	gacgaagagc	tgcttcacgc	cgagctcctt	cgcgtgcatg	1620
atggacctga	gcgaccgcaa	caaggcgaag	tgcgacgacc	cgggtccgct	ggagaacggc	1680
cacgcgacgc	tgcacggcca	gagcatcgac	ggcttctacg	cgggcagcag	catccgctac	1740
agctgcgagg	tgctgcacta	cctgagcggc	acggagaccg	tgacgtgcac	gacgaacggc	1800
acgtgggtccg	cgccgaagcc	gcgctgcatc	aaggtgatca	cgtgccagaa	cccgcgggtg	1860
ccgagctacg	gcagcgtgga	gatcaagccg	ccgtcgcgca	cgaactcgat	tagccgcgtg	1920
ggctcgcctg	tcttgcgtct	gccacgcctc	ccactgccgc	tggctcgtgc	ggccaagccg	1980
ccaccgaagc	cacgcagcag	ccagccgagc	acgggtggacc	tgccagcaa	ggtgaagctg	2040
ccggagggcc	actaccgcgt	gggtcgcgc	gcgatctaca	cgtgcgagag	ccgctactac	2100
gagctgctgg	gcagccaggg	tcgtcgtgc	gacagcaacg	gcaactggag	cggtcgcccg	2160
gctagctgca	tcccggtgtg	cggtcgcagc	gactccccgc	gctcgcggtt	catctggaac	2220
ggcaacagca	cggagatcgg	tcagtggccc	tggcaggcgg	gcatcagccg	ctggctggcc	2280
gaccacaaca	tgtggttcct	ccagtgcggc	ggcagcctgc	tgaacgagaa	gtggattgtg	2340
acggcggctc	actgogtgac	gtactcggcg	acggccgaga	tcatcgacc	gagccagttc	2400
aagatctacc	tgggcaagta	ctaccgcgac	gacagccgcg	acgacgacta	cgtgcaggtg	2460
cgcgagggcg	tggagatcca	cgtgaacccg	aactacgacc	cgggcaacct	gaacttcgat	2520
atcgcgctga	tccagctcaa	gacgccggtg	acgctgacga	cgcgcgtgca	gccgatctgc	2580
ctgccgacgg	acatcacgac	gcgcgagcac	ctgaaggagg	gcacgctggc	cgtcgtgacg	2640
ggctggggcc	tgaacgagaa	caacacgtac	agcgagatga	tccagcaggc	ggtgctgccg	2700
gtggtggcgg	cgagcacgtg	cgaggagggc	tacaaggagg	cggacctgcc	gctgacggtg	2760
acggagaaca	tggtctgcgc	gggtacaag	aagggccgct	acgacgcctg	cagcggtgac	2820
agcggcggtc	cgtggtggtt	cgcggacgac	agccgcacgg	agcgcgcgtg	ggtgctggag	2880
ggcatcgtga	gctggggcag	cccagcgggt	tgccgcaagg	cgaaccagta	cggcggcttc	2940
acgaaggtga	acgtgttcct	cagctggatc	cgccagttta	tc		2982

<210> 4
 <211> 994
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Secuencia de aminoácidos de la proteína sintética del Factor C (secuencia de aminoácidos codificada por

ES 2 674 079 T3

la secuencia de nucleótidos optimizada por codones de SEQ ID NO: 3)

<400> 4

Arg	Gly	Val	Asp	Leu	Gly	Leu	Cys	Asp	Glu	Thr	Arg	Phe	Glu	Cys	Lys	1	5	10	15
Cys	Gly	Asp	Pro	Gly	Tyr	Val	Phe	Asn	Val	Pro	Met	Lys	Gln	Cys	Thr	20	25	30	
Tyr	Phe	Tyr	Arg	Trp	Arg	Pro	Tyr	Cys	Lys	Pro	Cys	Asp	Asp	Leu	Glu	35	40	45	
Ala	Lys	Asp	Ile	Cys	Pro	Lys	Tyr	Lys	Arg	Cys	Gln	Glu	Cys	Lys	Ala	50	55	60	
Gly	Leu	Asp	Ser	Cys	Val	Thr	Cys	Pro	Pro	Asn	Lys	Tyr	Gly	Thr	Trp	65	70	75	80
Cys	Ser	Gly	Glu	Cys	Gln	Cys	Lys	Asn	Gly	Gly	Ile	Cys	Asp	Gln	Arg	85	90	95	
Thr	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Arg	Asp	Arg	Tyr	Glu	Gly	Ala	His	Cys	Glu	100	105	110	
Ile	Leu	Lys	Gly	Cys	Pro	Leu	Leu	Pro	Ser	Asp	Ser	Gln	Val	Gln	Glu	115	120	125	
Val	Arg	Asn	Pro	Pro	Asp	Asn	Pro	Gln	Thr	Ile	Asp	Tyr	Ser	Cys	Ser	130	135	140	
Pro	Gly	Phe	Lys	Leu	Lys	Gly	Val	Ala	Arg	Ile	Ser	Cys	Leu	Pro	Asn	145	150	155	160
Gly	Gln	Trp	Ser	Ser	Phe	Pro	Pro	Lys	Cys	Ile	Arg	Glu	Cys	Ala	Lys	165	170	175	
Val	Ser	Ser	Pro	Glu	His	Gly	Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Met	180	185	190	
Ile	Glu	Gly	Ala	Thr	Leu	Arg	Phe	Ser	Cys	Asp	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Leu	195	200	205	
Ile	Gly	Gln	Glu	Thr	Leu	Thr	Cys	Gln	Gly	Asn	Gly	Gln	Trp	Ser	Gly	210	215	220	

Gln Ile Pro Gln Cys Lys Lys Leu Val Phe Cys Pro Asp Leu Asp Pro
 225 230 235 240
 Val Asn His Ala Glu His Gln Val Lys Ile Gly Val Glu Gln Lys Tyr
 245 250 255
 Gly Gln Phe Pro Gln Gly Thr Glu Val Thr Tyr Thr Cys Ser Gly Asn
 260 265 270
 Tyr Phe Leu Met Gly Phe Asn Thr Leu Lys Cys Asn Pro Asp Gly Ser
 275 280 285
 Trp Ser Gly Ser Gln Pro Ser Cys Val Lys Val Ala Asp Arg Glu Val
 290 295 300
 Asp Cys Asp Ser Lys Ala Val Asp Phe Leu Asp Asp Val Gly Glu Pro
 305 310 315 320
 Val Arg Ile His Cys Pro Ala Gly Cys Ser Leu Thr Ala Gly Thr Val
 325 330 335
 Trp Gly Thr Ala Ile Tyr His Glu Leu Ser Ser Val Cys Arg Ala Ala
 340 345 350
 Ile His Ala Gly Lys Leu Pro Asn Ser Gly Gly Ala Val His Val Val
 355 360 365
 Asn Asn Gly Pro Tyr Ser Asp Phe Leu Gly Ser Asp Leu Asn Gly Ile
 370 375 380
 Lys Ser Glu Glu Leu Lys Ser Leu Ala Arg Ser Phe Arg Phe Asp Tyr
 385 390 395 400
 Val Ser Ser Ser Thr Ala Gly Arg Ser Gly Cys Pro Asp Gly Trp Phe
 405 410 415
 Glu Val Glu Glu Asn Cys Val Tyr Val Thr Ser Lys Gln Arg Ala Trp
 420 425 430
 Glu Arg Ala Gln Gly Val Cys Thr Asn Met Ala Ala Arg Leu Ala Val
 435 440 445
 Leu Asp Lys Asp Leu Ile Pro Ser Ser Leu Thr Glu Thr Leu Arg Gly
 450 455 460
 Lys Gly Leu Thr Thr Thr Trp Ile Gly Leu His Arg Leu Asp Ala Glu
 465 470 475 480

Lys Pro Phe Val Trp Glu Leu Met Asp Arg Ser Asn Val Val Leu Asn
 485 490 495
 Asp Asn Leu Thr Phe Trp Ala Ser Gly Glu Pro Gly Asn Glu Thr Asn
 500 505 510
 Cys Val Tyr Leu Asp Ile Arg Asp Gln Leu Gln Pro Val Trp Lys Thr
 515 520 525
 Lys Ser Cys Phe Gln Pro Ser Ser Phe Ala Cys Met Met Asp Leu Ser
 530 535 540
 Asp Arg Asn Lys Ala Lys Cys Asp Asp Pro Gly Pro Leu Glu Asn Gly
 545 550 555 560
 His Ala Thr Leu His Gly Gln Ser Ile Asp Gly Phe Tyr Ala Gly Ser
 565 570 575
 Ser Ile Arg Tyr Ser Cys Glu Val Leu His Tyr Leu Ser Gly Thr Glu
 580 585 590
 Thr Val Thr Cys Thr Thr Asn Gly Thr Trp Ser Ala Pro Lys Pro Arg
 595 600 605
 Cys Ile Lys Val Ile Thr Cys Gln Asn Pro Pro Val Pro Ser Tyr Gly
 610 615 620
 Ser Val Glu Ile Lys Pro Pro Ser Arg Thr Asn Ser Ile Ser Arg Val
 625 630 635 640
 Gly Ser Pro Phe Leu Arg Leu Pro Arg Leu Pro Leu Pro Leu Ala Arg
 645 650 655
 Ala Ala Lys Pro Pro Pro Lys Pro Arg Ser Ser Gln Pro Ser Thr Val
 660 665 670
 Asp Leu Ala Ser Lys Val Lys Leu Pro Glu Gly His Tyr Arg Val Gly
 675 680 685
 Ser Arg Ala Ile Tyr Thr Cys Glu Ser Arg Tyr Tyr Glu Leu Leu Gly
 690 695 700
 Ser Gln Gly Arg Arg Cys Asp Ser Asn Gly Asn Trp Ser Gly Arg Pro
 705 710 715 720
 Ala Ser Cys Ile Pro Val Cys Gly Arg Ser Asp Ser Pro Arg Ser Pro

725										730					735				
Phe	Ile	Trp	Asn	Gly	Asn	Ser	Thr	Glu	Ile	Gly	Gln	Trp	Pro	Trp	Gln				
			740					745					750						
Ala	Gly	Ile	Ser	Arg	Trp	Leu	Ala	Asp	His	Asn	Met	Trp	Phe	Leu	Gln				
		755					760					765							
Cys	Gly	Gly	Ser	Leu	Leu	Asn	Glu	Lys	Trp	Ile	Val	Thr	Ala	Ala	His				
	770					775					780								
Cys	Val	Thr	Tyr	Ser	Ala	Thr	Ala	Glu	Ile	Ile	Asp	Pro	Ser	Gln	Phe				
785					790					795					800				
Lys	Ile	Tyr	Leu	Gly	Lys	Tyr	Tyr	Arg	Asp	Asp	Ser	Arg	Asp	Asp	Asp				
				805					810					815					
Tyr	Val	Gln	Val	Arg	Glu	Ala	Leu	Glu	Ile	His	Val	Asn	Pro	Asn	Tyr				
			820					825					830						
Asp	Pro	Gly	Asn	Leu	Asn	Phe	Asp	Ile	Ala	Leu	Ile	Gln	Leu	Lys	Thr				
		835					840					845							
Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Arg	Val	Gln	Pro	Ile	Cys	Leu	Pro	Thr	Asp				
		850				855					860								
Ile	Thr	Thr	Arg	Glu	His	Leu	Lys	Glu	Gly	Thr	Leu	Ala	Val	Val	Thr				
865					870					875					880				
Gly	Trp	Gly	Leu	Asn	Glu	Asn	Asn	Thr	Tyr	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Gln				
				885					890					895					
Ala	Val	Leu	Pro	Val	Val	Ala	Ala	Ser	Thr	Cys	Glu	Glu	Gly	Tyr	Lys				
			900					905					910						
Glu	Ala	Asp	Leu	Pro	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asn	Met	Phe	Cys	Ala	Gly				
		915					920					925							
Tyr	Lys	Lys	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ala	Cys	Ser	Gly	Asp	Ser	Gly	Gly	Pro				
	930					935					940								
Leu	Val	Phe	Ala	Asp	Asp	Ser	Arg	Thr	Glu	Arg	Arg	Trp	Val	Leu	Glu				
945					950					955					960				
Gly	Ile	Val	Ser	Trp	Gly	Ser	Pro	Ser	Gly	Cys	Gly	Lys	Ala	Asn	Gln				
				965					970					975					

Tyr Gly Gly Phe Thr Lys Val Asn Val Phe Leu Ser Trp Ile Arg Gln
 980 985 990

Phe Ile

<210> 5
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Leishmania tarentolae
 <400> 5

Met Ala Ser Arg Leu Val Arg Val Leu Ala Ala Ala Met Leu Val Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Val Ser Val Asp Ala
 20

REIVINDICACIONES

1. Un protozoo parásito, que se **caracteriza por** albergar un polinucleótido que codifica la proteína del factor C del cangrejo herradura.
2. El protozoo parásito de la reivindicación 1, donde dicho polinucleótido está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, introducido en la célula huésped del protozoo parásito.
3. El protozoo parásito de la reivindicación 1 o 2, donde el protozoo parásito es un miembro del orden *Trypanosomatida*.
4. El protozoo parásito de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el protozoo parásito es un miembro del género *Leishmania*.
5. El protozoo parásito de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el protozoo parásito es *Leishmania tarentolae*.
6. El protozoo parásito de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho polinucleótido codifica la proteína del factor C de *Limulus polyphemus*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Tachypleus tridentatus* o *Tachypleus gigas*.
7. El protozoo parásito de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde dicho polinucleótido codifica la proteína del factor C que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.
8. Un método para producir proteína del factor C de cangrejo herradura, que comprende las etapas de:
 - (a) cultivar un protozoo parásito de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en condiciones tales que las células expresan la proteína del factor C codificada por el polinucleótido; y
 - (b) recuperar la proteína del factor C producida en la etapa (a) del cultivo celular.
9. El método de la reivindicación 8, donde dicha proteína del factor C se acumula en el medio de cultivo celular.
10. El método de la reivindicación 8 o 9, donde el protozoo parásito es un miembro del género *Leishmania*.
11. El método de la reivindicación 10, donde la proteína del factor C producida exhibe actividad de serina proteasa al unirse a la endotoxina.
12. La proteína del factor C de cangrejo herradura que tiene un peso molecular de aproximadamente 102 kDa según se determina por SDS-PAGE en condiciones no reductoras obtenible por
 - a) el método de la reivindicación 10; o
 - b) el método de la reivindicación 11.
13. Uso de la proteína del factor C de cangrejo herradura de la reivindicación 12b) en un método para la detección de endotoxina o en un método para la eliminación de endotoxina.
14. Un ensayo o kit para la detección de endotoxina o la eliminación de endotoxina, que comprende la proteína del factor C de cangrejo herradura de la reivindicación 12b).
15. Un proceso de generación de una célula huésped de protozoo parásito que produce proteína del factor C de cangrejo herradura, que comprende las etapas de:
 - (a) introducir una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, que comprende un polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura en un protozoo parásito, preferentemente un protozoo parásito del orden *Trypanosomatida*, más preferentemente un miembro del género *Leishmania*, de la forma más preferente *Leishmania tarentolae*; y
 - (b) seleccionar una o más células huésped producidas en la etapa (a) que expresan dicha proteína del factor C de cangrejo herradura.
16. Una célula huésped de protozoo parásito **caracterizada por** un polinucleótido que codifica la proteína del factor C de cangrejo herradura, donde dicho polinucleótido está compuesto por una molécula de ácido nucleico, preferentemente un vector, introducido en la célula huésped del protozoo parásito.

Figura 1

